

Université de Sherbrooke

**ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE LA NEUROFIBROMATOSE DE
TYPE 1 : DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE ET RECHERCHE
DE MUTATIONS**

par

Nader Chalhoub

Département de microbiologie

**Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie**

29 octobre 1996



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21727-2

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS

liste des figures iii

liste des tableaux..... iv

LISTE DES ABRÉVIATIONS..... v

RÉSUMÉ..... vii

I . INTRODUCTION

I.1 . Identification et caractéristiques du gène NF1 1

I.2 . Clinique et génétique de la NF1..... 5

I.3 . Buts de l'étude et stratégies utilisées..... 6

II . MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 . Collecte des échantillons de sang 8

II.2 . Établissement des lignées lymphoblastiques et conservation des
cellules 8

II.3 . Préparation des leucocytes et de leur ADN..... 9

II.4 . Étude des haplotypes..... 11

II.4.1 . Amplification par PCR des régions encadrant les
polymorphismes..... 11

II.4.2 . Analyse des produits de PCR..... 13

II.5 . Recherche de mutations à partir de l'ARNm du gène NF1 15

II.5.1 . Extraction des ARNs des lignées lymphoblastiques 15

II.5.2 . RT-PCR 16

II.5.3 . Analyse des produits amplifiés par RT-PCR 19

II.5.4 . Utilisation de l'enzyme résolvase pour identifier les
mutations ponctuelles..... 20

III . RÉSULTATS

III.1 . Étude des haplotypes..... 23

III.2 . Analyse de l'informativité des marqueurs utilisés dans l'étude des
haplotypes 37

III.3 . Recherche de mutations à partir de l'ARNm du gène NF1 38

III.3.1 . Recherche de mutations de délétion ou d'insertion par
migration électrophorétique 39

III.3.2 . Recherche des mutations ponctuelles par la résolvasse 43

IV . DISCUSSION..... 46

V . CONCLUSION ET PERSPECTIVES 51

REMERCIEMENTS..... 53

RÉFÉRENCES 54

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Cartographie du chromosome 17 dans la région du gène NF1	2
Figure 2 : Représentation schématique des principales voies de régulation de p21ras	4
Figure 3 : Explication schématique du polymorphisme de type RFLP	14
Figure 4 : Distribution des fragments de PCR amplifiés par les différents couples d'amorces sur l'ADNc du gène NF1	19
Figure 5 : Schéma décrivant la méthode suivie pour détecter les mésappariements de bases par la résolvasse	22
Figures 6 à 14 : Études des haplotypes de neuf familles NF1	28-36
Figure 15 : Vérification de la qualité des ARNs extraits.....	39
Figure 16 : Analyse moléculaire par électrophorèse en gel d'agarose 1 % des produits d'amplification par RT-PCR chez huit individus atteints de NF1	41
Figure 17 : Analyse moléculaire par électrophorèse en gel d'acrylamide non dénaturant 5 % des produits d'amplification par RT-PCR chez huit individus atteints de NF1	42
Figure 18 : Activité des enzymes résolvasse utilisées	44
Figure 19 : Traitement des homoduplexes et des hétéroduplexes d'ADN d'adénovirus avec T4E7.....	45

Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquences et caractéristiques des différents marqueurs de microsatellites utilisés dans l'étude des haplotypes 12

Tableau 2 : Séquences et caractéristiques des différentes amorces utilisées dans l'amplification de l'ADNc du gène NF1 18

Tableau 3 : Informativité des marqueurs utilisés dans l'analyse des haplotypes ... 37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : adénosine

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Bq : Becquerel

cM : centimorgan

C : cytidine

°C : degré Celsius

ADNc : ADN complémentaire

cpm : coup par minute

dATP : deoxyadenosine 5'-triphosphate

dCTP : deoxycytidine 5'-triphosphate

DEPC : diethyl pyrocarbonate

dGTP : deoxyguanosine 5'-triphosphate

DMSO : dimethyl sulfoxide

dNTP : deoxyribonucleoside triphosphate

DO : densité optique

DTT : dithiothreitol

dTTP : deoxythymidine 5'-triphosphate

E : exon

EDTA : ethylenediaminetetraacetate

FBS : foetal bovine serum

G : guanosine

HCl : acide chlorhydrique

I : intron

Kb : kilobase

KCl : chlorure de potassium

M : molaire

mM : millimolaire

mmol : millimole

mCi : milliCurie

MgCl₂ : chlorure de magnésium

min : minute

ml : millilitre

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

NE : sodium EDTA

NF1 : neurofibromatose de type 1

ng : nanogramme

nm : nanomètre

nts : nucléotides

pb : paire de base

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

RFLP : restriction fragment length polymorphism

rpm : révolution par minute

T : thymidine

TAE : tris acetate EDTA

TBE : tris borate EDTA

W.T : wild type

α : alpha

μCi : microCurie

μg : microgramme

μl : microlitre

μM : micromolaire

RÉSUMÉ

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie autosomique dominante. Elle affecte toutes les ethnies avec une incidence de 1 pour 3500 naissances. 50 % des cas sont d'origine familiale et 50 % sont sporadiques. L'expression de cette maladie est très variable et la fréquence des mutations nouvelles est très élevée, ce qui pose un problème dans le diagnostic clinique. En effet, le diagnostic moléculaire grâce à l'étude de linkage des haplotypes avec des marqueurs de polymorphismes de l'ADN est la solution pour les cas familiaux. Par contre pour les cas sporadiques, l'identification des mutations liées à la maladie est la seule solution.

Dans ce travail, nous avons analysé les haplotypes de neuf familles NF1 de la province de Québec en utilisant des marqueurs très informatifs de type microsatellites et un marqueur RFLP. Ces marqueurs nous ont permis d'identifier l'allèle muté et par conséquent un diagnostic présymptomatique ou prénatal partiel de la maladie NF1 est possible. Grâce à ces marqueurs, il a été possible d'identifier deux délétions dues à une perte d'hétérozygotie chez deux familles.

Chez huit individus NF1 sporadiques, nous avons analysé les produits d'amplification de tout l'ADNc par RT-PCR afin d'éviter d'analyser l'ADN génomique de NF1 qui est de grande taille et dans le but d'identifier les mutations de délétions ou d'insertions. Nous avons aussi essayé de mettre au point une technique de détection des mésappariements de bases par l'enzyme résolvasse afin d'identifier les mutations ponctuelles du gène NF1.

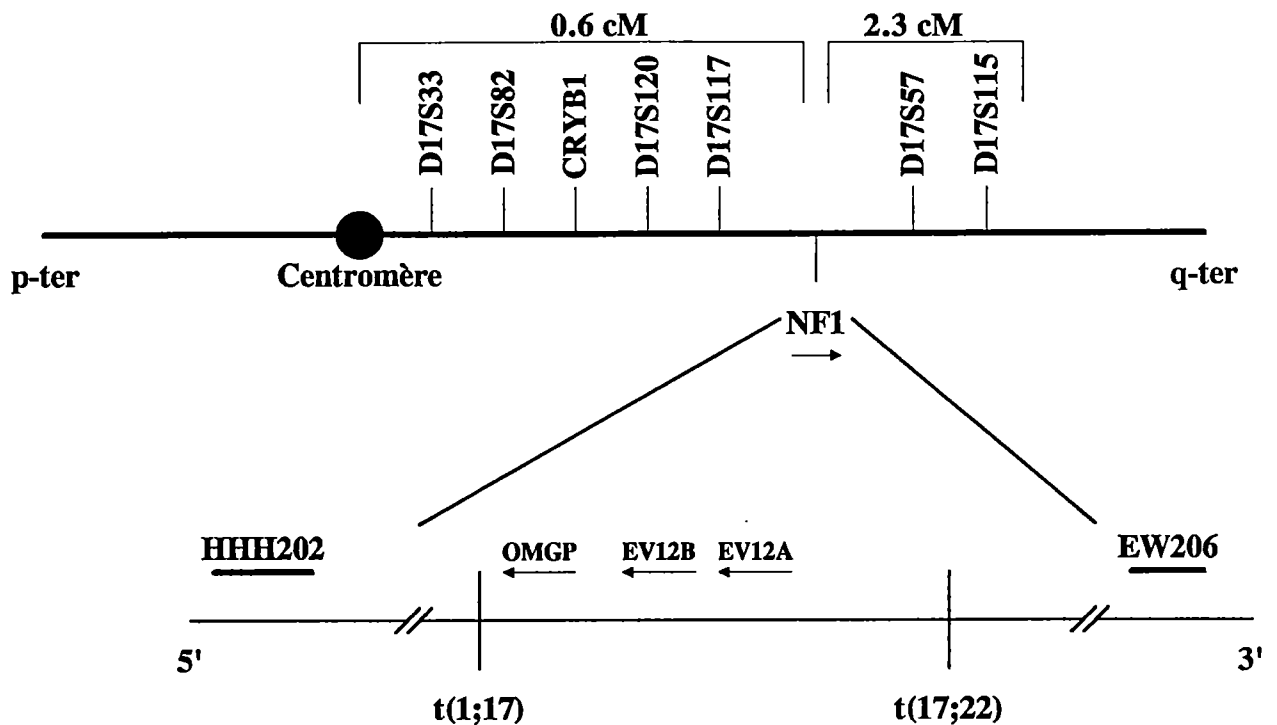
I . INTRODUCTION

La neurofibromatose de "von Recklinghausen" ou neurofibromatose de type 1 (NF1) est une des maladies génétiques les plus fréquentes. C'est une maladie autosomique dominante, affectant toutes les ethnies avec une incidence de 1 pour 3500 naissances. Elle comporte une très haute fréquence de mutations spontanées (environ 50 %), sa pénétrance est quasi complète et son expressivité très variable même au sein d'une même famille. Les altérations génétiques de cette maladie affectent le gène NF1 localisé sur le chromosome 17 (Riccardi, 1992).

I.1 . Identification et caractéristiques du gène NF1

Le gène NF1 a été identifié par clonage positionnel puisque la nature exacte de la protéine était initialement inconnue. En 1987, le gène a été localisé dans la région péricentromérique du chromosome 17 (Barker et al., 1987 ; Seizinger et al., 1987). La mise en évidence de translocations équilibrées chez deux patients atteints de NF1 [t(1;17) (p34.3;q11.2) et t(17;22) (q11.2;11.2)] a ensuite permis de localiser le gène en 17q11.2 et de le cloner (Schmidt et al., 1987 ; Fountain et al., 1989 ; Ledbetter et al., 1989 ; Menon et al., 1989 ; O'Connell et al., 1989) (Figure 1).

En juillet 1990, les groupes de F. Collins (Wallace et al., 1990) et R. White (Viskochil et al., 1990 ; Cawthon et al., 1990b) ont simultanément isolé l'ADNc du gène NF1. Le gène s'étend sur plus de 300 Kb, contient plus que 53 exons (Upadhyaya et al., 1994) et présente la particularité de contenir à l'intérieur de l'intron 27 trois gènes transcrits en direction opposée : EV12A (Cawthon et al., 1990a ; O'Connell et al., 1990), EV12B (Cawthon et al., 1991) et OMGP (Viskochil et al., 1991). Il n'existe pas aujourd'hui d'arguments permettant d'impliquer l'un de ces trois gènes



Sont indiqués :

- La position des différents locus, les sondes et les enzymes de restriction utilisées pour identifier le gène NF1

<u>Locus</u>	<u>Sonde</u>	<u>Enzyme</u>
D17S33	pHHH202	Rsa I
D17S82	pTH17.19	Bgl II
CRYB1	pB8.2	Msp I
D17S120	pVAW215R3	Taq I
D17S117	pVAW212	Pst I
D17S115	pVAW210M2	Msp I
D17S57	pEW206	Msp I

- Les points des deux translocations : t(1;17) et t(17;22)
- Les trois transcrits exprimés à l'intérieur de l'intron 27 du gène NF1 : OMGP, EV12A, EV12B

Figure 1 : Cartographie du chromosome 17 dans la région du gène NF1.

dans l'apparition de manifestations cliniques particulières de la maladie. Deux pseudogènes NF1 ont été isolés et localisés respectivement sur les chromosomes 15 et 22 (Legius et al., 1992 ; Marchuk et al., 1992). La taille de l'ARNm correspondant au gène NF1 est de 13 Kb. Il comporte une phase ouverte de lecture de 8454 nucléotides et son expression est pratiquement ubiquitaire (Marchuk et al., 1991 ; Bernards et al., 1992). Cet ARNm code pour une protéine de 2818 acides aminés, appelée neurofibromine, d'un poids moléculaire théorique de 327 Kd et localisée dans le cytoplasme de la plupart des types cellulaires analysés (Gutmann et al., 1991 ; DeClue et al., 1991). Par immunocytochimie, il a été suggéré que cette protéine cytoplasmique pourrait interagir avec les microtubules du cytosquelette et ainsi intervenir dans la mise en place correcte du programme de division cellulaire (Gutmann et Collins, 1993). Les analyses de comparaison de séquence ont permis de reconnaître une région de 360 résidus similaire au domaine catalytique de type GTPase des protéines p120^{GAP} de mammifères, Ira1p, Ira2p et sar1 de levure (*Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*) et GAP1 de drosophile (Xu et al., 1990a ; Xu et al., 1990b ; Buchberg et al., 1990 ; Martin et al., 1990 ; Ballester et al., 1990 ; Wang et al., 1991 ; Gaul et al., 1992). Parmi ces 360 résidus, quinze sont absolument conservés et jouent très probablement un rôle fonctionnel important (Wang et al., 1991).

La fonction commune de ces molécules est de stimuler la conversion de la forme active de RAS liée au GTP en une forme inactive liée au GDP (Bourne et al., 1990). La neurofibromine est donc très certainement impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire en régulant négativement le proto-oncogène p21^{ras} par stimulation de son activité GTPasique intrinsèque, d'où son rôle de gène suppresseur de tumeurs (Basu et al., 1992 ; DeClue et al., 1992) (Figure 2). Il est intéressant de noter qu'il existe au niveau de ce domaine un épissage alternatif de l'exon 23a (constitué de 63 nucléotides) qui génère deux isoformes actives de la neurofibromine : le type I correspondant à la séquence classiquement décrite et le type II qui possède une insertion

de 21 acides aminés (Marchuk et al., 1991 ; Bernards et al., 1992 ; Nishi et al., 1991 ; Suzuki et al., 1991 ; Teinturier et al., 1992 ; Andersen et al., 1993). Un second épissage alternatif intéressant l'exon 48a (constitué de 54 nucléotides) a été décrit au niveau de la partie C-terminale de la protéine (Marchuk et al., 1991 ; Bernards et al., 1992). Par conséquent, le gène NF1 code pour au moins quatre protéines pouvant avoir différentes fonctions dans différents tissus.

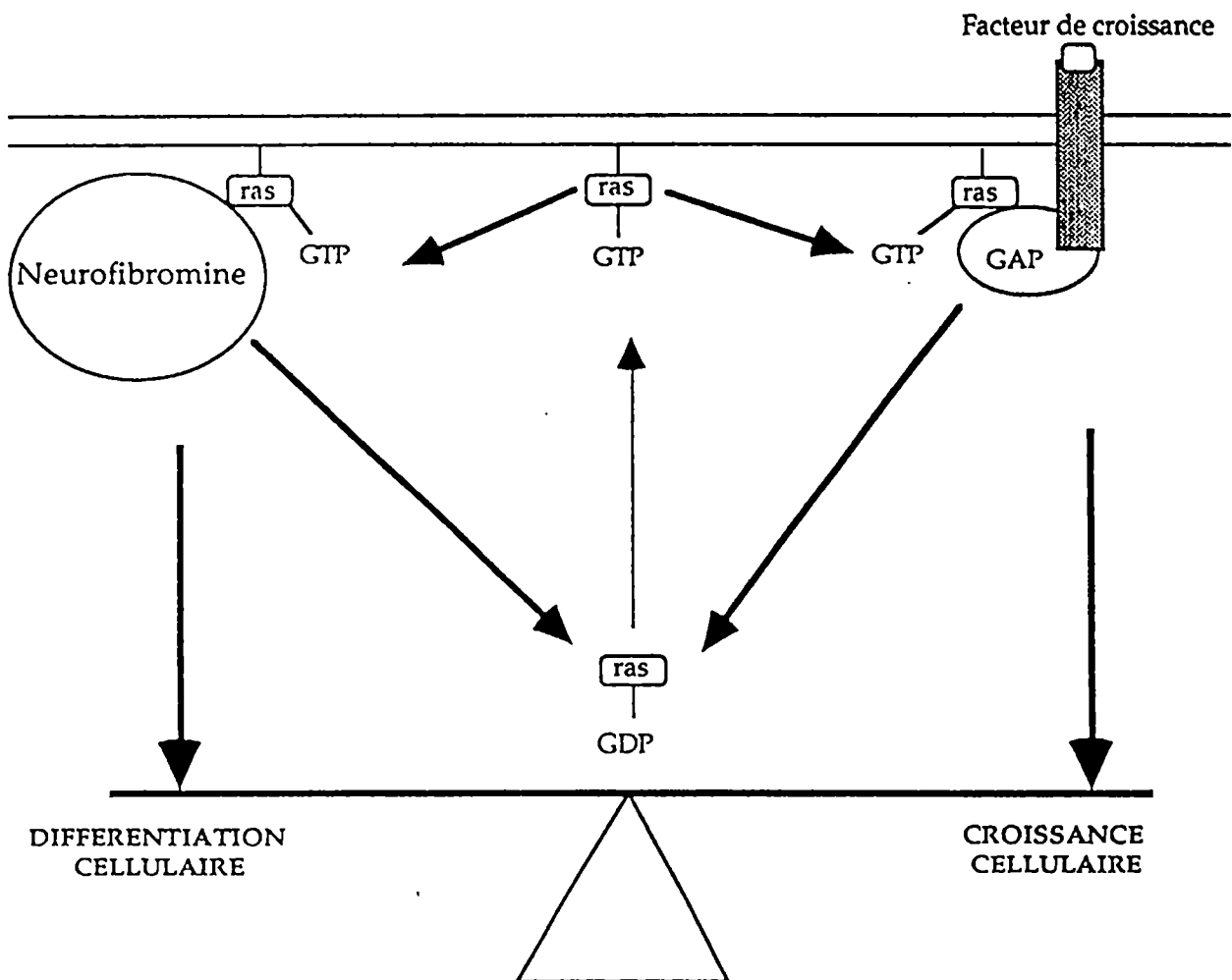


Figure 2 : Représentation schématique des principales voies de régulation de p21^{ras}.

I.2 . Clinique et génétique de la NF1

La NF1 est une des maladies où le taux de mutation est le plus élevé : 10^{-4} par gamète et par génération. Cette maladie affecte essentiellement les tissus d'origine neuroectodermique et se caractérise par :

- L'extrême variabilité des tableaux cliniques observés.
- La très haute fréquence de mutations nouvelles, le plus souvent d'origine paternelle (Riccardi et al., 1984 ; Jadayel et al., 1990).
- La survenue chez environ 5 % des malades de complications tumorales redoutables.

Les signes cliniques majeurs de cette maladie sont des neurofibromes cutanés, des taches "café au lait" et des nodules de Lisch. Cette variation de l'expressivité, ajoutée aux difficultés diagnostiques dans les formes frustes, est à l'origine des très grandes difficultés rencontrées à l'occasion du conseil génétique, d'où la nécessité de faire appel aux techniques de la biologie moléculaire pour confirmer un diagnostic incertain ou établir un diagnostic présymptomatique ou prénatal, et aussi afin d'établir la corrélation qui pourrait exister entre le type de mutation et la gravité de la maladie soit la corrélation entre phénotype et génotype.

Dans les cas familiaux, le diagnostic repose sur l'analyse de la ségrégation des polymorphismes de l'ADN (Upadhyaya et al., 1992 ; Rodenhiser et al., 1993). Dans les cas sporadiques, l'utilisation des polymorphismes de l'ADN est la plupart du temps inopérante, puisque la neurofibromatose est une maladie dominante ; l'identification de la mutation causale de la maladie est alors la seule possibilité. Cependant comme on le verra dans deux cas, l'utilisation des polymorphismes permet la détection de délétions grâce à la perte d'hétérozygotie. Le diagnostic direct devient alors possible. Il est à

noter cependant que la détection du gène muté ne permet pas encore de savoir si l'affection revêtira une forme bénigne, voire frustre ou une forme très sévère.

I.3 . Buts de l'étude et stratégies utilisées

Les deux objectifs principaux de mon projet sont :

a) D'établir un diagnostic moléculaire pour les familles atteintes de NF1 dans la province de Québec et de vérifier l'existence d'un effet fondateur. Afin d'atteindre cet objectif, des marqueurs de polymorphismes de type microsatellites sont utilisés en plus d'un marqueur de type RFLP. À noter que les marqueurs de RFLP ont été le plus souvent utilisés dans l'analyse des haplotypes jusqu'à la découverte des microsatellites qui se sont révélés plus informatifs et plus avantageux.

Les microsatellites sont des séquences répétées de nucléotides, bien souvent de type $(CA)_n$, qui varient en nombre dans la population ; les RFLPs sont des polymorphismes d'un site de restriction. L'avantage majeur de ces microsatellites par rapport aux RFLPs est qu'ils sont multi-alléliques alors que les RFLPs sont bi-alléliques, ce qui les rend beaucoup plus informatifs en terme de pourcentage d'hétérozygotie. Ce sont des facteurs importants dans l'établissement d'un diagnostic moléculaire. Les marqueurs de microsatellites choisis proviennent du GeneBank. Quatre de ces marqueurs sont intragéniques et deux sont extragéniques au gène NF1.

Pour mes expériences, j'utiliserai ces différents marqueurs afin d'identifier l'allèle porteur de la mutation qui est transmis d'un individu à un autre au sein des familles dans le but d'exclure les suivis médicaux pour les personnes qui ne sont pas à risque et de pourvoir le conseil génétique. Cela me permettra en même temps d'étudier l'informativité des microsatellites et d'identifier à l'occasion les mutations de délétions résultant en une perte d'hétérozygotie du locus NF1 dans les cas familiaux.

b) De rechercher des mutations de NF1 dans les cas sporadiques. Vu la grande taille du gène NF1 (> 300 Kb), l'ARNm (13 Kb) sera analysé plutôt que le gène au complet limitant ainsi ma recherche à la région codante. En effet, comme le gène NF1 est exprimé dans les lignées lymphoblastiques, il est possible de rechercher les mutations en étudiant l'ARNm extrait de ces lignées, ce qui simplifie grandement l'analyse et autorise la détection de mutations introniques responsables d'anomalies d'épissage.

Un large répertoire d'oligonucléotides couvrant la totalité de l'ADNc ont été utilisés afin d'amplifier par PCR l'ADNc au complet. En comparant la taille de chaque produit d'amplification, il me serait possible d'identifier les mutations de délétion ou d'insertion.

Quant aux mutations ponctuelles, elles seront étudiées par la technique de mésappariement de bases entre un type sauvage et un type muté en se servant d'un enzyme spécifique aux mésappariements, la résolvasse qui coupe l'ADN au niveau de la mutation.

Pour mon mémoire, j'ai choisi d'étudier neuf familles comprenant 42 individus. Les haplotypes de ces familles ont été établis en utilisant les différents marqueurs. Les résultats obtenus montrent clairement l'informativité supérieure des microsatellites par rapport aux RFLPs et permettent d'établir un diagnostic présymptomatique chez les individus qui n'ont pas encore développé les symptômes de la maladie et dont l'un des parents est atteint.

Chez deux familles, nous avons observé des cas de perte d'hétérozygotie résultant chaque fois d'une délétion dans le gène NF1.

Pour ce qui est de la recherche des mutations dans les cas sporadiques, huit individus ont été analysés par RT-PCR, mais aucune mutation n'a été détectée. Concernant la résolvasse, l'un des deux enzymes utilisées était actif mais pas assez spécifique pour détecter les mésappariements.

II . MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 . Collecte des échantillons de sang

Les familles atteintes de NF1 et les cas sporadiques proviennent de trois cliniques de la province de Québec : clinique du Dr Bernard Lemieux du département de pédiatrie du CUSE, des Drs Ortenberg et Rouleau du "Montreal Children's Hospital" et du Dr Ruest du centre hospitalier de Rimouski. Pour chaque famille, le pedigree retraçant l'histoire de la maladie dans la famille et identifiant les membres atteints était fourni.

Un échantillon de sang (20 ml) est prélevé pour chaque membre de la famille ainsi que pour les patients sans histoire familiale (cas sporadique). Environ 10 ml de ce sang sont prélevés sur EDTA pour en extraire l'ADN afin de faire l'analyse des haplotypes, et 10 autres ml sont prélevés sur acide citrate dextrose et envoyés à Montréal (laboratoire du Dr. Rouleau) pour transformation et préparation de lignées lymphoblastiques. Après transformation, ces lignées sont envoyées dans notre laboratoire où elles sont cultivées afin d'en extraire l'ARN et d'en congeler pour utilisation ultérieure.

II.2 . Établissement des lignées lymphoblastiques et conservation des cellules

Les lignées lymphoblastiques ont été établies dans le laboratoire de Dr. Rouleau à "Montreal General Hospital" par transformation des cellules mononucléées du sang périphérique (10 ml prélevés sur acide citrate dextrose dans des conditions stériles et maintenues à température ambiante) par le virus d'Epstein-Barr, en présence de cyclosporine A (0.1 µg/ml de culture) et cultivées à 37°C, avec 5 % de CO₂, en milieu ISCOVE (Gibco BRL) additionné de 10 % de sérum de veau foetal.

Les lignées sont cultivées à 37°C en présence de 5 % CO₂ en milieu ISCOVE avec 10 % de sérum de veau foetal. Des aliquotes de 2x10⁶ cellules sont ensuite conservés par congélation dans l'azote liquide dans un milieu ISCOVE avec 10 % de sérum de veau foetal et 10 % de DMSO. La congélation est graduelle à raison de 1°C par minute. Ceci permet de conserver du matériel pour chaque proposant et de préparer de l'ARN pour les études fonctionnelles et la recherche des mutations du gène NF1.

D'autres aliquotes de 2x10⁶ cellules sont aussi congelés à -20°C sous forme de culots cellulaires de lymphocytes. 2x10⁶ cellules/2 ml de milieu de culture sont centrifugés pendant 5 min à 12000 rpm et à la température de la pièce. Le surnageant éliminé, le culot de cellules est lavé avec 1 ml de PBS (pH 7.4 : 0.14 M NaCl, 2.6 mM KCl, 5.3 mM Na₂HPO₄ et 1.7 mM KH₂PO₄). Après centrifugation à 12000 rpm pendant 2 min à la température du laboratoire, le culot est conservé à -20°C pour en extraire l'ADN.

II.3 . Préparation des leucocytes et de leur ADN

L'ADN génomique est extrait des leucocytes pour déterminer les haplotypes des familles de la façon suivante : à un tube à centrifugation de 15 ml contenant les 10 ml de sang prélevés en présence d'EDTA, on dépose soigneusement au fond du tube 4 ml d'une solution à base de FICOLL (HISTOPAQUE-1077 de SIGMA) avec une pipette pasteur. Après centrifugation à 1000 rpm pendant 15 min à la température de la pièce, on prélève les globules blancs à l'interface entre le plasma (couche supérieure) et la solution d'HISTOPAQUE contenant les globules rouges (couche inférieure). Les globules blancs sont ensuite lavés une fois délicatement par aspiration douce avec 10 ml de PBS pour se débarrasser du plasma et du FICOLL. Les leucocytes sont recueillis par centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min à 23°C puis resuspendus dans 6 ml de NaCl hypotonique 0.2 % afin de lyser les globules rouges restants. Après 1 min 1/2 à la température ambiante, on rajoute 6 ml de NaCl hypertonique 1.6 %, on mélange par

renversements et on recueille les leucocytes par centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min à la température du laboratoire. Les leucocytes sont resuspendus dans 2 ml de PBS et comptés avec un hémacytomètre. Les leucocytes sont ensuite aliquotés à raison de 2×10^6 cellules par tube. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 5 min à la température ambiante, les culots de leucocytes sont congelés à -20°C .

Pour préparer l'ADN des leucocytes, ceux-ci sont lysés dans 500 μl de tampon NE (105 mM NaCl, 26.38 mM EDTA pH 8) avec 0.5 % de SDS et 200 $\mu\text{g/ml}$ de protéinase K dans un bain marie à 50°C toute la nuit. Le lendemain, l'ADN est extrait une fois avec du phénol puis deux fois avec du phénol:chloroforme:isoamyl alcool (25:24:1). Pour chaque extraction, les solutions sont agitées par retournement, centrifugées 5 min à 12000 rpm, puis le surnageant est récupéré avec un embout coupé pour éviter de briser l'ADN. Finalement, chaque solution est extraite trois fois avec 250 μl de CHCl_3 . À la phase aqueuse, on ajoute 1/2 volume d'acétate d'ammonium 7.5M, on mélange par retournement puis on ajoute doucement deux volumes d'éthanol 100 % à la température du laboratoire. On laisse la méduse se former en agitant doucement par rotation, puis on la récupère à l'aide d'une pipette pasteur fermée au bout et on la lave deux fois dans de l'éthanol 70 %. Après avoir laissé sécher l'ADN sur la pipette, on le resuspend dans 300 μl d'eau bidistillée stérile pendant deux jours à 4°C . La concentration de l'ADN est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm, sachant qu'une unité de DO correspond à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin. Cet ADN est utilisé pour les PCR.

II.4 . Étude des haplotypes

II.4.1 . Amplification par PCR des régions encadrant les polymorphismes

Microsatellites : La réaction de PCR est réalisée dans un volume total de 20 µl contenant 2 µl de tampon 10X de réaction de PCR (tampon 10X de Pharmacia : 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ et 100 mM Tris-HCl pH 9.0), 0.5 µl de chaque dNTP (2 mM), 0.5 µl de chaque amorce (20 µM), 0.2 µl de Taq polymérase de Pharmacia (5 U/µl), 0.2 µl de [α -³²P]dCTP (Amersham 3000 Ci/mme, 25 µCi/µl) et 1 µl d'ADN génomique (100 ng/µl). Le volume est complété à 20 µl avec de l'eau bidistillée stérile. Le programme d'amplification comprend une dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivie de 27 cycles de : dénaturation 20 sec à 94°C, appariement 20 sec à 52°C, 55°C ou 58°C selon les couples d'amorces utilisés (**voir tableau 1**) et élongation 30 sec à 72°C + 1 sec à chaque cycle. On termine par une élongation de 7 min à 72°C. L'échantillon est ensuite gardé à 4°C. Le tableau 1 regroupe les différents marqueurs de microsatellites (intragéniques et extragéniques) utilisés pour l'identification des haplotypes, avec les températures d'appariement des oligonucléotides.

Nom d'identification du marqueur	Séquence en nucléotides	Type de répétition	Localisation par rapport au gène NF1	Température d'appariement	Taille attendue de l'amplification
26I-1	5'-AGGCCAGGAGTTCAAGACCA-3'	(TAGA) (TAGG)	Intragénique	58°C	≈206 pb
26I-2	5'-ATGAGCCACTGTGCCCAATC-3'	(TAAGA)	intron 26		
27III-1	5'-TGAAGTATGCAGTTTTCCAG-3'	(CA)	Intragénique	55°C	≈213-225 pb
27III-2	5'-GGCTAAGTGTAACGCAAAG-3'		intron 27		
27IV-1	5'-TAGATTATATGGGACAGAAAATG-3'	(CA)	Intragénique	55°C	≈104-124 pb
27IV-2	5'-CTTGAGGTGATGACAGGATG-3'		intron 27		
38I-1	5'-CAGAGCAAGACCCTGTCT-3'	(CA)	Intragénique	52°C	≈171-187 pb
38I-2	5'-CTCCTAACATTTATTAACCTTA-3'		intron 38		
D17S250-1	5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3'	(CA)	Extragénique	55°C	≈162 pb
D17S250-2	5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3'		région 3' télomérique		
D17S925-1	5'-CACATGGTAGGTGCCTAATAA-3'	(CA)	Extragénique	55°C	≈151-165 pb
D17S925-2	5'-GGCAGGCTCTGGTGAA-3'		région 5' centromérique		

Tableau 1 : Séquences et caractéristiques des différents marqueurs de microsatellites utilisés dans l'étude des haplotypes avec leurs températures d'appariement appropriées.

Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) : Le polymorphisme utilisé est un site de restriction pour l'enzyme RsaI dans l'exon 5 du gène NF1 (Hoffmeyer et Assum, 1994). Deux amorces : 5E-1 (5'-CATGTGGTTCTTTATTTATAGGC-3' : situé dans l'intron 4 sauf pour GC dans l'exon 5) et 5E-2 (5'-CCAAGTCAAATAGCTTTTCTGC-3' : localisé dans l'exon 6) sont utilisées pour amplifier une région de 800 pb couvrant l'exon 5, l'intron 5 et une partie de l'exon 6. L'amplification par PCR est faite dans 50 µl contenant 5 µl de tampon 10X de réaction de PCR (tampon 10X de Pharmacia : 500mM KCl, 15mM MgCl₂ et 100mM Tris-HCl pH 9.0), 2 µl de chaque dNTP (10 mM), 0.5 µl de chaque amorce (5E-1 et 5E-2)(20 µM), 0.5 µl de Taq polymérase de Pharmacia (5 U/µl) et 3 µl d'ADN génomique (100 ng/µl). Les conditions du PCR sont les suivantes : dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivie de 35 cycles aux températures suivantes : dénaturation 1 min à 92°C, appariement 1 min à 52°C et élongation 1 min à 72°C. À la fin une élongation finale de 10 min à 72°C, puis le tout est conservé à 4°C.

II.4.2 . Analyse des produits de PCR

Microsatellites : Les produits d'amplification pour les marqueurs de microsatellites sont analysés par électrophorèse sur gel à 8 % d'acrylamide dénaturant en présence de 4 M urée. Une séquence référence de pUC 19 servant d'échelle de poids moléculaire est migrée sur gel en même temps. Le gel dénaturant permet de séparer et de distinguer des fragments variant d'un nucléotide ou plus. La préparation du gel dénaturant, ainsi que les conditions d'électrophorèse ont été tirées du manuel d'instructions du kit de séquençage de la compagnie Pharmacia Biotech (T7 Sequencing Kit). Au produit d'amplification sont ajoutés 5 µl de la solution STOP (T7 Sequencing Kit de Pharmacia) et 3 µl du mélange sont chargés sur le gel (occasionnellement, le produit de PCR est concentré à l'éthanol pour obtenir un signal plus fort sur gel). Le

plasmide pUC 19 a été extrait de la bactérie *Escherichia Coli* selon la méthode des mini-préparations décrite dans Maniatis (Sambrook et al., 1989) et a été séquencé selon la procédure C et D du kit de séquençage de Pharmacia en utilisant du [α - 32 P]dCTP (Amersham 3000 Ci/mmol, 25 μ ci/ μ l) et avec une modification apportée au protocole : 10M NaOH a été utilisé à la place de 2M NaOH parce que cette dernière concentration n'était pas capable de dénaturer complètement l'ADN du pUC 19. Environ 3 μ l de chaque réaction de séquence de pUC 19 sont introduits dans chaque puit du gel. Le temps d'électrophorèse varie selon la taille du produit d'amplification.

Après électrophorèse, une exposition pendant 24 heures est effectuée dans une cassette sans écran intensifiant. Les bandes correspondant aux différents allèles sont localisées sur le gel en se référant à leur taille et à l'échelle fournie par la séquence de pUC 19. Chaque allèle est identifié selon le poids moléculaire obtenu et le résultat est rapporté aux pedigrees de chaque famille afin d'identifier l'allèle porteur de la mutation.

Détermination du RFLP : 25 μ l des produits d'amplification par PCR de la région de l'exon 5 sont digérés pendant 3 heures avec 2 unités de *Rsa*I (Pharmacia) dans un volume total de 50 μ l contenant 1X tampon One-Phor-All (tampon 10X de Pharmacia : 100mM Tris-acétate pH 7.5, 100mM magnésium acétate et 500mM potassium acétate). Les produits digérés sont ensuite analysés par électrophorèse à 80 volts sur un gel d'agarose 1 % dans le tampon TBE (Sambrook et al., 1989). Les produits présentant le polymorphisme de restriction représenté par la présence d'un fragment de 450 pb sur le gel, sont identifiés et rapportés aux pedigrees de chaque famille.

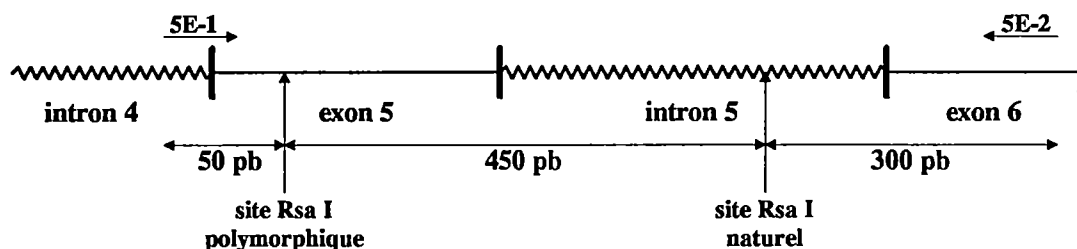


Figure 3 : Explication schématique du polymorphisme de type RFLP.

II.5 . Recherche de mutations à partir de l'ARNm du gène NF1

II.5.1 . Extraction des ARNs des lignées lymphoblastiques

Les ARNs totaux sont extraits à partir des lignées lymphoblastiques en culture en utilisant la solution TRIzol (Gibco BRL). Après centrifugation des cellules en culture et lavage au PBS, environ 3×10^6 cellules sont lysées dans 1 ml de la solution de TRIzol (solution à base de phénol monophasique et d'isothiocyanate de guanidine) en mélangeant vigoureusement. Après 5 min à la température du laboratoire, on ajoute 200 μ l de chloroforme. Le tout est vortexé pendant 30 sec, incubé 5 min à 0°C, puis centrifugé durant 15 min à 12000 rpm à 4°C. Les ARNs sont récupérés dans la phase aqueuse alors que l'ADN et les protéines se retrouvent dans la phase inférieure de couleur rouge. Les ARNs sont précipités avec 500 μ l d'isopropanol et gardés à 0°C pendant 10 min, puis culottés par centrifugation 15 min à 12000 rpm et à 4°C. Le culot d'ARN est rincé deux fois à l'éthanol-H₂O-DEPC (Sambrook et al., 1989) 70 % puis centrifugé pendant 5 min à 12000 rpm et à 4°C. Le culot est ensuite séché et resuspendu dans 30 μ l d'eau bidistillée stérile contenant 1 % de diéthylpyrocarbonate (H₂O-DEPC).

La quantification des ARNs s'effectue par spectrophotométrie à 260 nm, sachant qu'une unité de DO correspond à une concentration d'ARN de 40 μ g/ml. La qualité des ARNs extraits est déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % en tampon TBE. Un marqueur de poids moléculaire est déposé sur le même gel afin d'identifier les bandes des ARNs 28S et 18S. Ces ARNs sont conservés à -20°C pour faire les RT-PCR.

II.5.2 . RT-PCR

À partir des ARNs, on synthétise les ADNc correspondants à l'aide de la reverse transcriptase. Les ADNc sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques au gène NF1 (**Figure 4**) de la façon suivante :

Transcription inverse : 1.2 µg d'ARN total est transcrit en ADNc dans un volume final de 20 µl contenant 4 µl de tampon 5X de réaction (AMV RT 5X tampon de réaction de Promega : 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT et 2.5 mM spermidine), 2 µl de DTT (0.11 M), 1 µl de chaque dNTP (10 mM), 1 µl de RNasin (RNasin de Promega : 40 U/µl) comme inhibiteur des ribonucléases, 1 µl d'amorce hexamérique pd(N)₆ de Pharmacia (50 µM) et 1 µl d'enzyme reverse transcriptase (AMV Reverse transcriptase de Promega : 5 U/µl).

Le programme de transcription inverse est : 10 min à 20°C, suivi d'une heure à 37°C, puis le tout est conservé à 4°C.

PCR : Les couples d'amorces utilisés pour amplifier ensuite par PCR la totalité de l'ADNc du gène NF1 sont tirés de l'article de Hoffmeyer et al. (Hoffmeyer et al., 1994a). Une erreur s'est glissée dans cet article au niveau de la séquence de l'amorce I/2 correspondant à K3 dans le tableau 2 : un nucléotide T en trop a été ajouté dans cette séquence. La séquence exacte est → AGATAACTCTGTCATTTTCCTAC. Les séquences de ces couples d'amorces, ainsi que la taille de leurs produits d'amplification se retrouvent dans le tableau 2.

L'amplification par PCR est effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 5 µl d'ADNc, 2.5 µl de tampon 10X de réaction de PCR de Pharmacia, 0.5 µl de chaque dNTP (10 mM), 0.5 µl de Taq de Pharmacia (5 U/µl) et 0.5 µl de chaque amorce (20 µM). Le programme d'amplification comprend une dénaturation initiale à 96°C pendant 5 min suivie de 35 cycles aux températures suivantes : dénaturation 1 min à 93°C,

appariement 1 min à 50°C, 54°C ou 56°C selon les couples d'amorces utilisés (voir **tableau 2**) et élongation 2 min à 72°C. À la fin une élongation finale à 72°C pendant 10 min, puis le tout conservé à 4°C.

Nom d'identification des couples d'amorce	Séquence nucléotidique des amorces	Température d'appariement	Taille du fragment amplifié
K1	5'-GGACATGGCCGCGCACAG-3'	54°C	635 pb
K2	5'-GCTAACTGCGCAACCTTCTTT-3'		
K3	5'-AGATAACTCTGTCATTTTTCCTAC-3'	54°C	995 pb
K4	5'-CTATCCATAGAGGAGTTCCT-3'		
K5	5'-CTGTATCCAATGCTATTTAACAAA-3'	50°C	895 pb
K6	5'-AGAGCCATCGCTATAGGGAG-3'		
K7	5'-CAGAGCACAAACCTGTGGCA-3'	56°C	1132 pb
K8	5'-TCTAACGTGAGGTGTGGCTC-3'		
K9	5'-CCAGTGGACAGAACTAGCTC-3'	54°C	1258 pb
K10	5'-TGGCCTCTGCTAAGTATTCATA-3'		
K11	5'-TAGTCGCATTTCTACCAGGTTA-3'	54°C	632 pb
K12	5'-GAGAATGGCTTACTTGGATTA-3'		
K13	5'-TCCTTCTAGTGGAATACCAGT-3'	54°C	1035 pb
K14	5'-GCTGCCTTCAGTATGATTATCT-3'		
K15	5'-GCACTCCATAGGCTTAGGTTA-3'	54°C	1261 pb
K16	5'-TCCCAGCTTTGGAAGTCCCA-3'		
K17	5'-GTGCCTTAACCTGTACCTTAAT-3'	54°C	1160 pb
K18	5'-TTATCTGCCCATGAGACACTC-3'		
K19	5'-CTGTTCTAGCTACACTGGTAAA-3'	50°C	875 pb
K20	5'-GGCTTCGAAGAGTTGATCATC-3'		

Tableau 2 : Séquences et caractéristiques des différentes amorces utilisées dans l'amplification de l'ADNc du gène NF1.

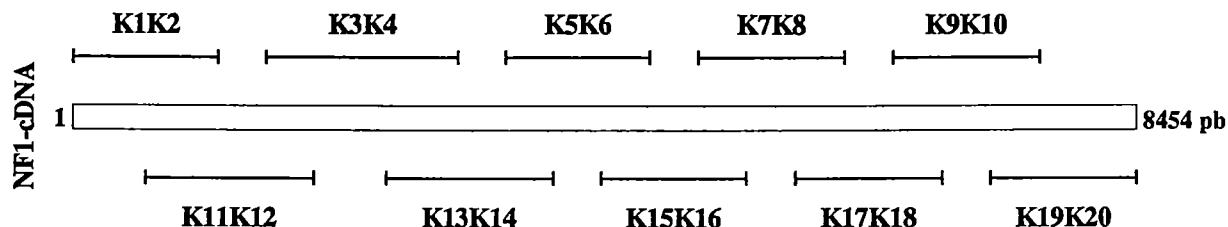


Figure 4 : Distribution des fragments de PCR amplifiés par les différents couples d'amorces sur l'ADNc du gène NF1.

II.5.3 . Analyse des produits amplifiés par RT-PCR

Les différents fragments amplifiés par RT-PCR, correspondant aux personnes NF1 et à une personne de type sauvage (contrôle : W.T), sont d'abord vérifiés sur gel d'agarose 1 % en tampon TBE puis électroélués selon la méthode décrite dans Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) afin de se débarrasser des artefacts de PCR. Les fragments électroélués sont alors analysés par électrophorèse à 500 volts sur un gel d'acrylamide 5 % non dénaturant en tampon TBE (Sambrook et al., 1989) pour rechercher les petites délétions ou insertions, et à 80 volts sur un gel d'agarose 1 % en tampon TBE pour la recherche des grandes délétions ou insertions, en présence de marqueurs de poids moléculaire (1 Kb).

En comparant les différents types, il est théoriquement possible d'identifier la présence d'une délétion ou insertion dans la région analysée. Environ 10 µl des 25 µl de chaque produit de PCR sont chargés sur chaque gel (agarose et acrylamide) et les 5 µl restants sont utilisés pour la recherche des mutations ponctuelles par la méthode de mésappariement de bases (résolvase).

II.5.4 . Utilisation de l'enzyme résolvasse pour identifier les mutations ponctuelles

Les deux sources de résolvasse utilisées (T4 endonucléase VII et T7 endonucléase I) nous ont été fournies par le laboratoire de Dr Mashal (Harvard Medical School). L'activité de ces deux enzymes a été testée de deux manières :

*1 µg d'ADN superenroulé (pUC 19 "supercoiled") sont incubés avec 50ng de T4E7 ou 80ng de T7E1 en présence de 1X tampon de réaction (tampon 5X : 0.25 M Tris-HCl pH 8.0, 0.25 M glutamate de potassium, 0.05 M MgCl₂ et 25 mM DTT), 0.1 µg d'ADN de sperme de saumon fragmenté et dénaturé (Sambrook et al., 1989) dans un volume total de 10 µl. Avec T7E1, la réaction s'accomplit comme ci-dessus mais avec en plus 7.5 % de DMSO. Cela permet de vérifier la capacité de la résolvasse à linéariser la forme superenroulée en y créant des cassures.

*L'autre méthode consiste à tester si la résolvasse est capable de digérer au niveau des mésappariements "mismatches" des hétéroduplexes obtenus à partir du mutant et du W.T de l'adénovirus de la façon suivante : des fragments de 696 pb du W.T et du mutant, CA→GC respectivement, d'ADN d'adénovirus dont la séquence et la taille sont connues ont été utilisés afin de générer des hétéroduplexes contenant des mésappariements CA-CG à 321 pb de l'extrémité 3'. Cette expérience sera appliquée par la suite aux hétéroduplexes des individus NF1 (la méthode utilisée est expliquée ci dessous, sauf que c'est l'ADN de l'adénovirus qui a été utilisé à la place de l'ADNc) (Mashal et al., 1995) (Figure 5).

Formation des hétéroduplexes et incubation avec la résolvasse : Après amplification d'un fragment d'ADNc sauvage en présence de 5 µl [α -³²P]dCTP (Amersham 3000 Ci/mme, 25 µCi/µl) et d'un fragment d'ADNc muté sans [α -³²P]dCTP, 5 ng du type sauvage radioactif sont mélangés à 50 ng du type muté en présence

de 1X tampon de réaction (tampon 2X : 1.2 M NaCl, 12 mM Tris-HCl pH 7.5 et 14 mM MgCl₂) dans un volume final de 50 µl. Une fois le mélange chauffé 5 min à 95°C, on le laisse se refroidir doucement jusqu'à 50°C à raison de 1°C par minute (dans une machine à PCR : thermocycle). Cette méthode de formation d'hétéroduplexes permet de révéler deux sortes de duplexes (W.T radioactif-mutant froid et W.T radioactif-W.T radioactif) ; les duplexes de type mutant froid-mutant froid n'apparaissent pas sur l'autoradiogramme. L'autre méthode utilisée pour la formation d'hétéroduplexes lors de la réaction de PCR d'un ADNc muté en présence de dCTP radioactif révèle trois sortes de duplexes en plus de duplexes dus à des artefacts qui peuvent survenir lors de la réaction de PCR. C'est pour cette raison que nous n'avons utilisé que la première méthode dans notre expérience.

Les hétéroduplexes sont ensuite précipités à l'éthanol, puis incubés 1 heure à 37°C en présence de 1X tampon de réaction (tampon 5X : 0.25 M Tris-HCl pH 8.0, 0.25 M glutamate de potassium, 0.05 M MgCl₂ et 25 mM DTT), 50 ng T4E7 et 0.5 µg d'ADN de sperme de saumon fragmenté et dénaturé (Sambrook et al., 1989), dans un volume final de 50 µl.

Après précipitation à l'éthanol, les hétéroduplexes traités avec la résolvasse sont resuspendus dans 5 µl de solution STOP (Pharmacia) et analysés par électrophorèse à 500 volts sur un gel d'acrylamide non dénaturant de 8 % (Sambrook et al., 1989) en présence d'un contrôle de type normal (homoduplexe W.T-W.T) traité avec la résolvasse T4E7 et d'un marqueur de taille (1 Kb). Le film est exposé pendant 48 heures dans une cassette avec deux écrans intensifiants. La présence d'une mutation ponctuelle résulte en une digestion par T4E7 et ainsi en des fragments supplémentaires apparaissant sur le gel par rapport au type sauvage (voir figure 5 pour l'explication de la technique de détection des mésappariements de bases par la résolvasse).

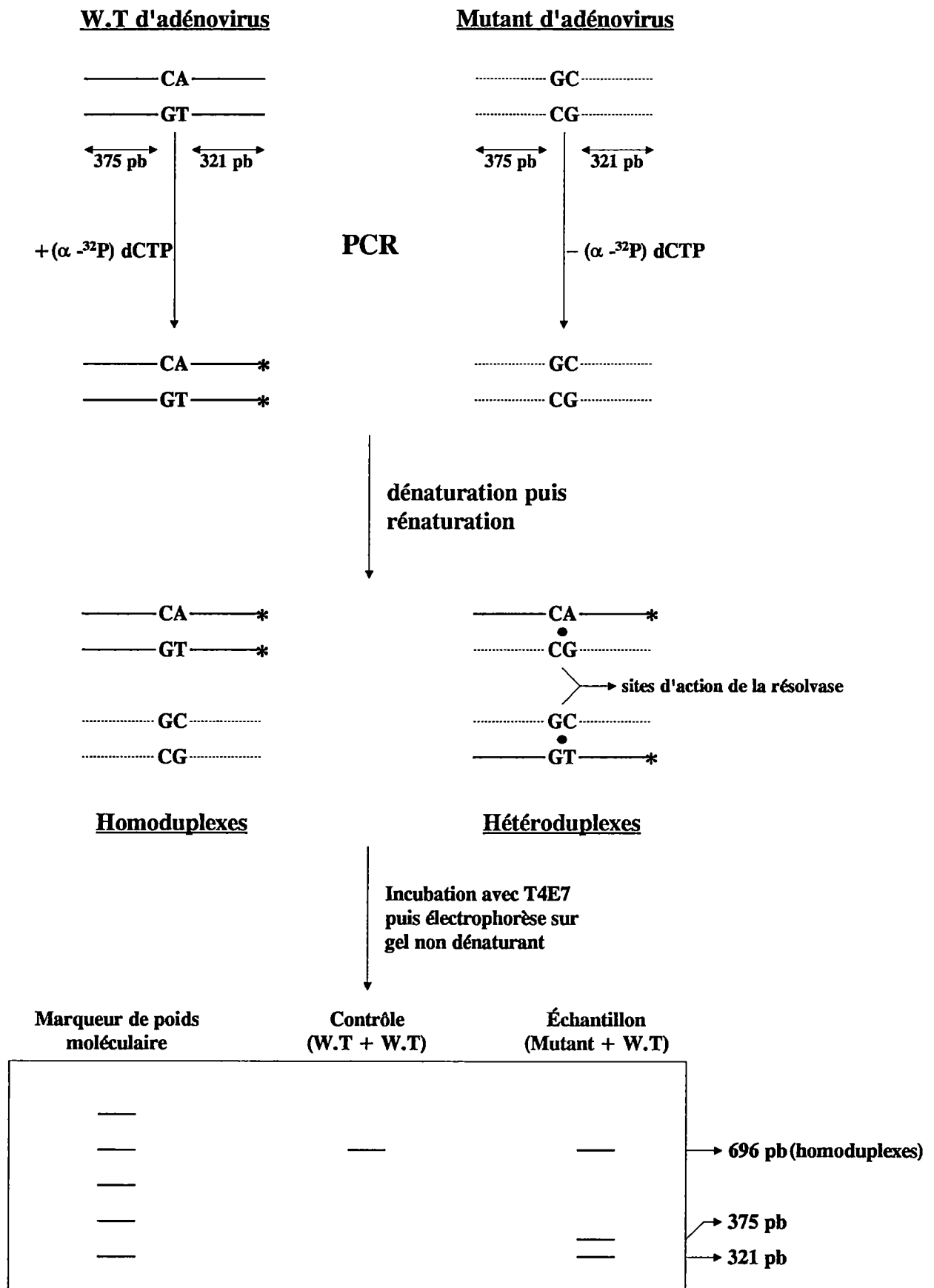


Figure 5 : Schéma décrivant la méthode suivie pour détecter les mésappariements de bases par la résolvasse.

III . RÉSULTATS

III.1 . Étude des haplotypes

Nous avons étudié neuf familles, dont au moins un membre était atteint de NF1. Parmi ces familles, on dénombre sept cas familiaux (**figures 6 à 12**) et deux cas sporadiques (**figures 13 et 14**). Les sept cas familiaux présentaient des familles idéales pour l'établissement d'un diagnostic présymptomatique parce que chacune d'elles comprenait au moins un ou deux enfants atteints et parfois un autre enfant non atteint. Les deux autres familles (cas sporadiques) ont été étudiées pour analyser l'informativité des marqueurs utilisés et pour la recherche de délétions grâce à la perte d'hétérozygotie.







Sur les sept marqueurs choisis (microsatellites et RFLP), les PCR avec cinq marqueurs intragéniques ont bien fonctionné alors que ceux avec les deux marqueurs extragéniques n'ont pas fonctionné. En effet, l'amplification par PCR avec les marqueurs extragéniques ne s'est pas produite comme prévue dû probablement aux conditions utilisées lors du PCR. Ces marqueurs extragéniques auraient pu donner des résultats intéressants pour notre étude ; ils nous auraient permis de détecter par exemple la présence ou l'absence d'une recombinaison génétique entre les deux gènes NF1.

Comme on le verra, les cinq marqueurs intragéniques utilisés ont permis, en l'absence d'un événement de recombinaison intragénique, d'identifier selon toute vraisemblance l'allèle porteur de la mutation causale de la maladie (**figures 6 à 12**). De plus, ces mêmes marqueurs ont permis d'identifier chez deux familles (**figures 9 et 12**) deux mutations de délétion dues à la perte d'hétérozygotie.

Pour les sujets identifiés comme porteur d'une mutation ou d'une perte d'hétérozygotie, l'étude clinique par identification des symptômes concordait

parfaitement avec nos résultats, c'est à dire que les symptômes de la maladie étaient présents chez toutes les personnes porteuses de l'allèle muté, à l'exception d'une famille (**figure 10**) où on a identifié un individu porteur de l'allèle muté mais qui était selon toute vraisemblance asymptomatique.

Les figures 6 à 14 montrent les pedigrees des neuf familles étudiées ainsi que leurs haplotypes déterminés par PCR et après électrophorèse sur gel dénaturant comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les polymorphismes qui ont été déterminés sont D17S250, 38I, 27IV, 27III, 26I, 5E et D17S925 qui sont localisés respectivement à l'extérieur du côté 3' télomérique, dans l'intron 38, deux dans l'intron 27, dans l'intron 26, dans l'exon 5 et à l'extérieur du côté 5'. Voir section II.4.1 dans Matériel et Méthodes pour les conditions de PCR utilisées afin d'amplifier ces régions polymorphiques. Les symboles utilisés pour lire ces pedigrees sont les suivants :

- | | |
|--|--|
|  : homme non atteint |  : homme atteint |
|  : femme non atteinte |  : femme atteinte |
| ? : non déterminé | |
|  : allèle porteur et malade |  : allèle non porteur et sain |
| 0 : délétion | |
| nts : nucléotides | |
| + : présence du site Rsa I dans l'exon 5 (polymorphisme RFLP) | |
| - : absence du site Rsa I dans l'exon 5 (polymorphisme RFLP) | |

Les chiffres dans les pedigrees indiquent la taille en nucléotide de chaque région polymorphique amplifiée par PCR avec les marqueurs utilisés.

Dans chaque encadré, la photographie des gels représente les résultats obtenus avec chaque membre de la famille. Sur ces gels, ce sont les bandes les plus intenses qui correspondent aux allèles des individus. Les autres bandes moins intenses sont les résultats des erreurs de la Taq polymérase qui peut parfois ajouter ou omettre des nucléotides. Ce phénomène est souvent observé lors de l'amplification des microsatellites de répétitions (CA) et plus rarement dans les répétitions de quatre nucléotides ou plus (TAGA, TAGG, TAAGA).

Concernant le marqueur RFLP, l'absence d'une bande à 800 pb correspondant au produit de PCR, démontre que la digestion de ce fragment par RsaI a été complète.

La figure 6 montre le pedigree d'une famille sur deux générations. On constate que chez les deux enfants II-1 et II-2, c'est la disposition (187, 108, 219, 211, –) qui définit le chromosome porteur de la mutation. Lorsqu'on examine la maman I-2, on constate qu'elle est homozygote pour les cinq caractères et que par conséquent chez elle on ne sait pas lequel des deux chromosomes est porteur de la mutation. Seule une étude plus approfondie avec d'autres marqueurs permettrait de trancher entre ces deux chromosomes.

La figure 7 montre le pedigree d'une famille sur trois générations. Les résultats montrent que c'est la combinaison (185, 106, 219, 213, –) qui définit le chromosome porteur de la mutation puisqu'elle est commune au grand-père I-1 et à la mère II-1. Pour le garçon III-1, cette combinaison existe pour les deux chromosomes et il n'est donc pas possible d'identifier pour l'instant lequel des deux chromosomes est porteur de la mutation. Par contre, on peut souligner que sa soeur III-2 n'est, en toute

vraisemblance, pas porteuse de la mutation et que par conséquent elle ne devrait pas développer les symptômes de la maladie.

La figure 8 montre le pedigree d'une famille sur trois générations. Les résultats montrent que c'est la combinaison (173, 116, 217, 206, -) qui définit le chromosome porteur de la mutation puisqu'elle se retrouve chez la grand-mère I-1, les deux mères II-2 et II-3 et chez les deux enfants III-2 et III-3. On remarque bien le caractère hétérozygote chez tous les membres de cette famille ce qui permet de poser un diagnostic présymptomatique pour les individus asymptomatiques.

La figure 9 montre le pedigree d'une famille sur trois générations. Les résultats sont très intéressants car on a pu identifier la mutation. C'est la combinaison (187, 108, 217, 210, 0) qui définit le chromosome porteur de la mutation. Lorsque le RFLP pour les individus a été déterminé, on a constaté que le père II-2 était hétérozygote $+/-$ et que la mère II-1 était homo ou hémizygote ($-/-$ ou $-/0$ respectivement), alors que les deux filles III-1 et III-2 étaient, contre toute attente, homo ou hémizygotes ($+/+$ ou $+/0$ respectivement). Les deux filles auraient dû avoir un allèle - en provenance de leur mère si cette dernière était homozygote $-/-$. Comme la figure montre que ce n'est pas le cas, la seule possibilité est que l'on est en présence d'une délétion de l'allèle chez la mère II-1 qui couvre l'exon ou partie de l'exon 5 et qui s'arrête quelque part avant ou dans l'intron 26 puisque chez la mère et chez les enfants on observe les hétérozygoties au niveau des autres marqueurs étudiés.

La figure 10 montre le pedigree d'une famille sur deux générations. Les résultats montrent que c'est la combinaison (189, 108, 217, 206, -) qui définit le mieux le chromosome porteur de la mutation. La fille II-1 et le garçon II-2 sont homozygotes pour les cinq marqueurs et sont tous les deux porteurs de l'allèle muté. La fille est

atteinte alors que le garçon ne présente pas de signes symptomatiques. Il y a eu peut être un événement de recombinaison entre les deux copies du gène à moins qu'il ne soit encore qu'asymptomatique (voir discussion pour plus de détails).

La figure 11 montre une famille composée de trois individus. Les résultats montrent que c'est la combinaison (173, 116, 217, 210, -) qui définit le chromosome porteur de la mutation puisqu'elle est commune aux deux personnes atteintes soit la mère I-1 et la fille II-1. Dans le cas de la fille, on observe qu'elle est homozygote pour les cinq marqueurs et que pour elle le conseil génétique est pour l'instant problématique à moins que l'on puisse identifier d'autres marqueurs.

La figure 12 montre une autre famille très intéressante composée de trois individus. Les résultats montrent que la mère I-1 devrait être soit hémizygote soit homozygote pour les cinq marqueurs (181, 116, 225, 207, +). De même, on constate que le fils II-1 est soit hémizygote soit homozygote pour les cinq marqueurs (183, 106, 217, 213, -) qui sont les mêmes que pour l'un des chromosomes du père. Par conséquent, ces résultats ne peuvent être obtenus que si le fils et la mère sont hémizygotes et que l'un des gènes NF1 de la mère et du fils est délété pour la région s'étendant au moins du RFLP dans l'exon 5 au marqueur 38I dans l'intron 38 du gène.

Les figures 13 et 14 montrent des formes sporadiques de NF1 chez deux familles de deux générations. Les résultats ne mettent en évidence aucune délétion. Aucune perte d'hétérozygotie n'est observée avec les marqueurs analysés. Comme dans neuf cas sur dix le chromosome qui subit la mutation provient du père, on peut supposer que se sont les chromosomes avec les combinaisons (187, 114, 225, 210, - dans la figure 13) et (173, 114, 215, 203, - dans la figure 14) qui sont porteurs de la mutation.

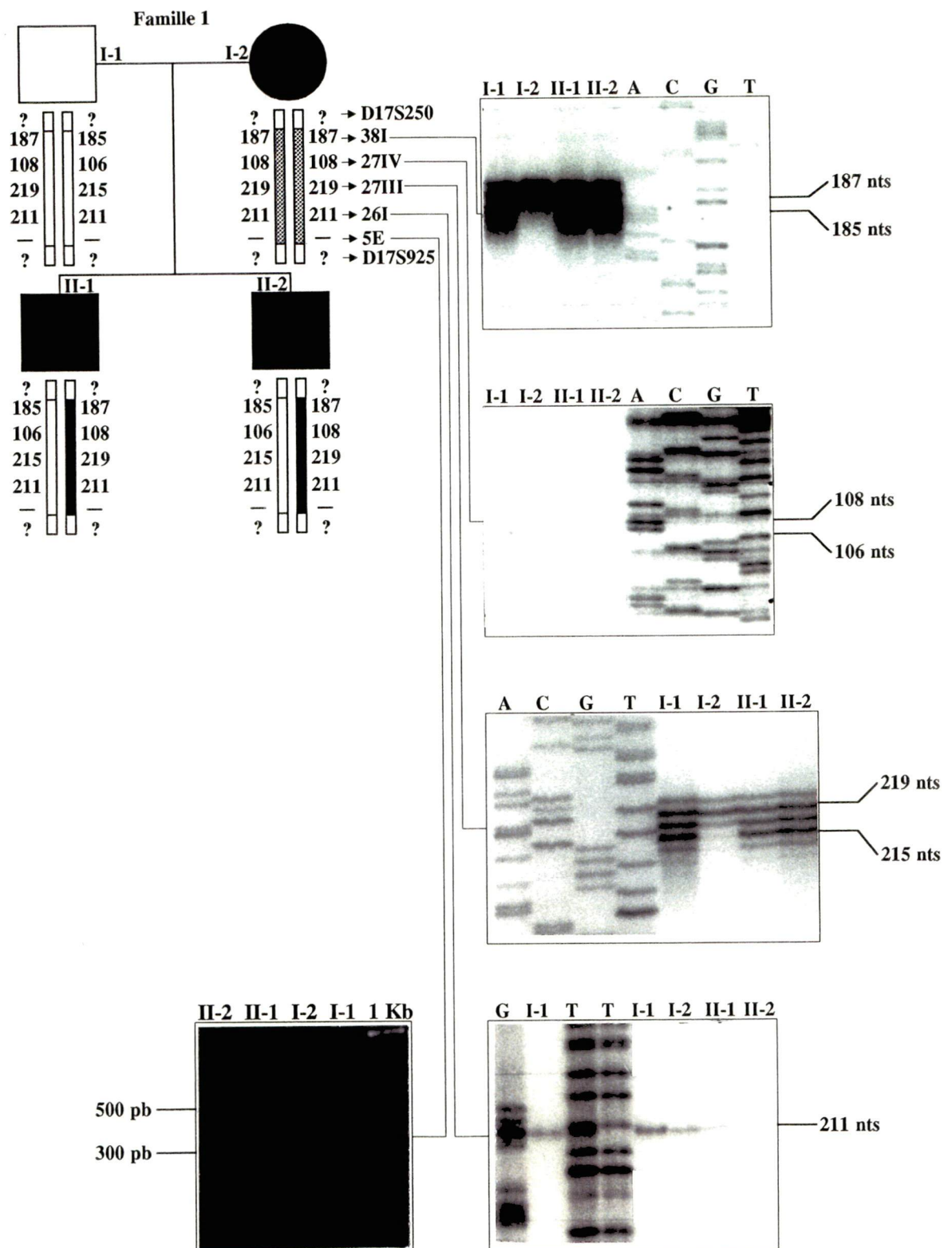


Figure 6 : Étude des haplotypes d'une famille NF1 de deux générations. L'allèle en noir (187, 108, 219, 211, -) est porteur de la mutation alors que ceux en gris pointillé indiquent que l'un des deux allèles est porteur.

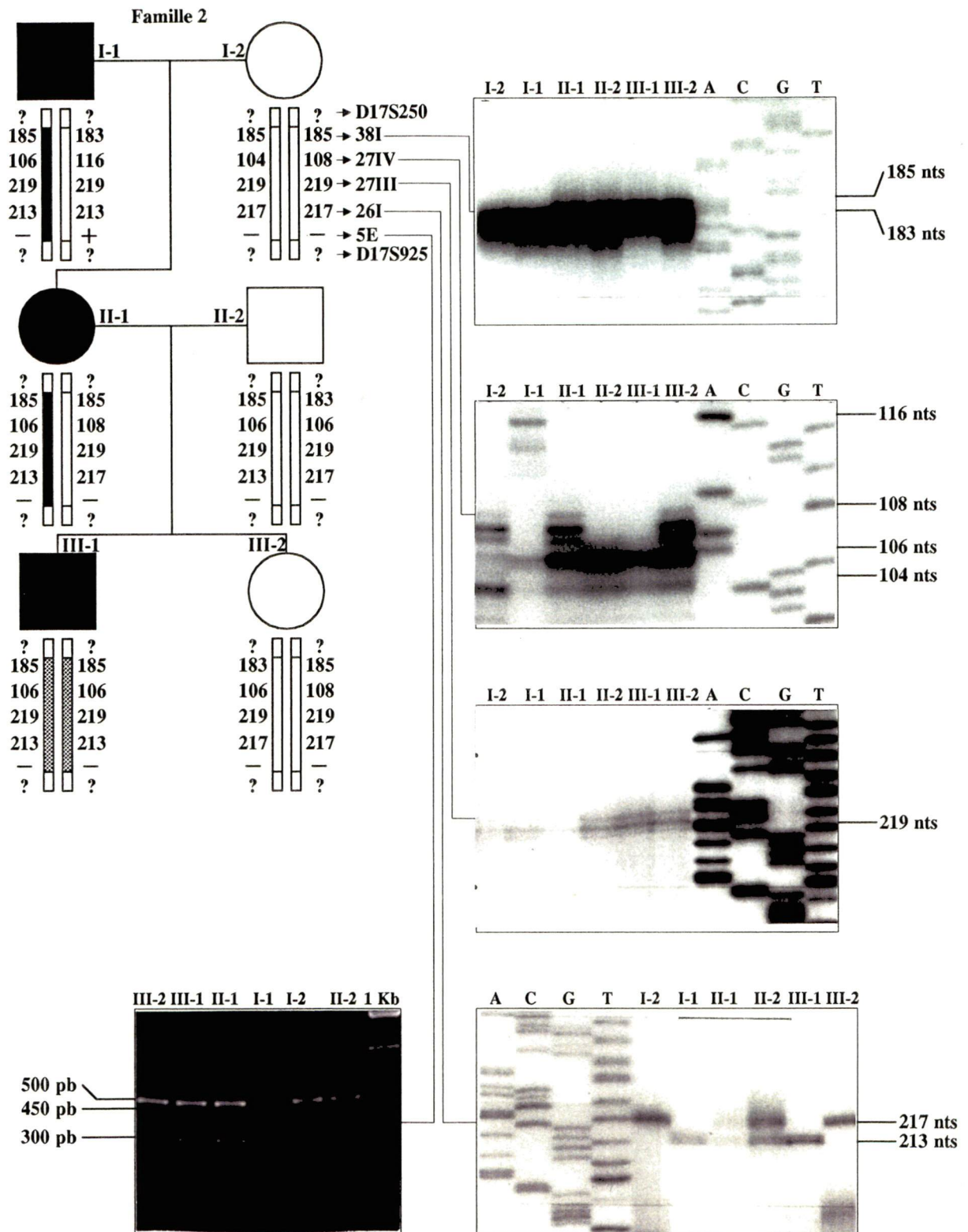


Figure 7 : Étude des haplotypes d'une famille NF1 de trois générations. L'allèle en noir (185, 106, 219, 213, -) est porteur de la mutation alors que ceux en gris pointillé indiquent que l'un des deux allèles est porteur.

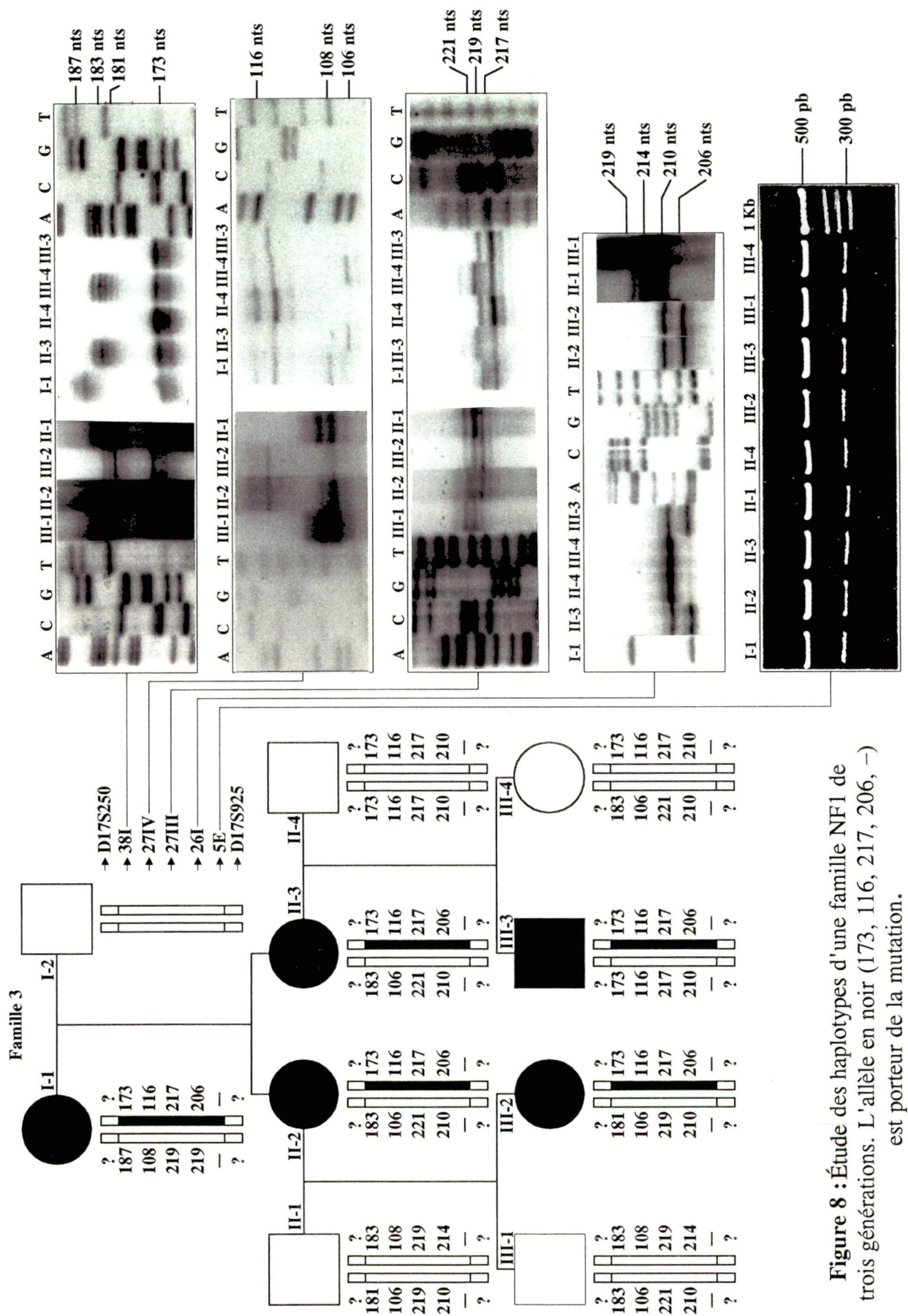


Figure 8 : Étude des haplotypes d'une famille NF1 de trois générations. L'allèle en noir (173, 116, 217, 206, -) est porteur de la mutation.

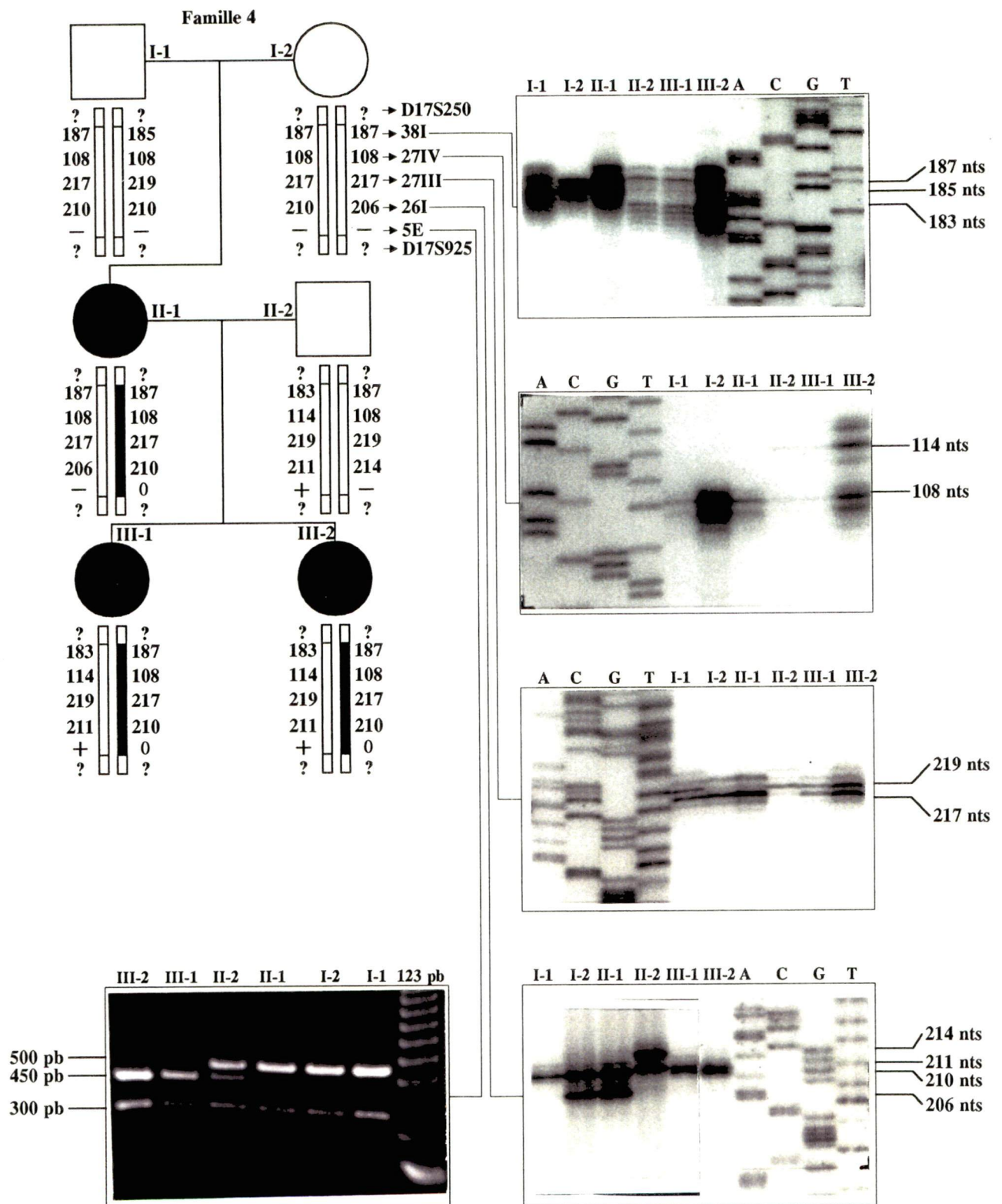


Figure 9 : Étude des haplotypes d'une famille de trois générations. L'allèle en noire (187, 108, 217, 210, 0) est porteur de la mutation qui est une mutation de délétion grâce à la perte d'hétérozygotie. Cette délétion est identifiée par le chiffre 0 dans le pedigree.

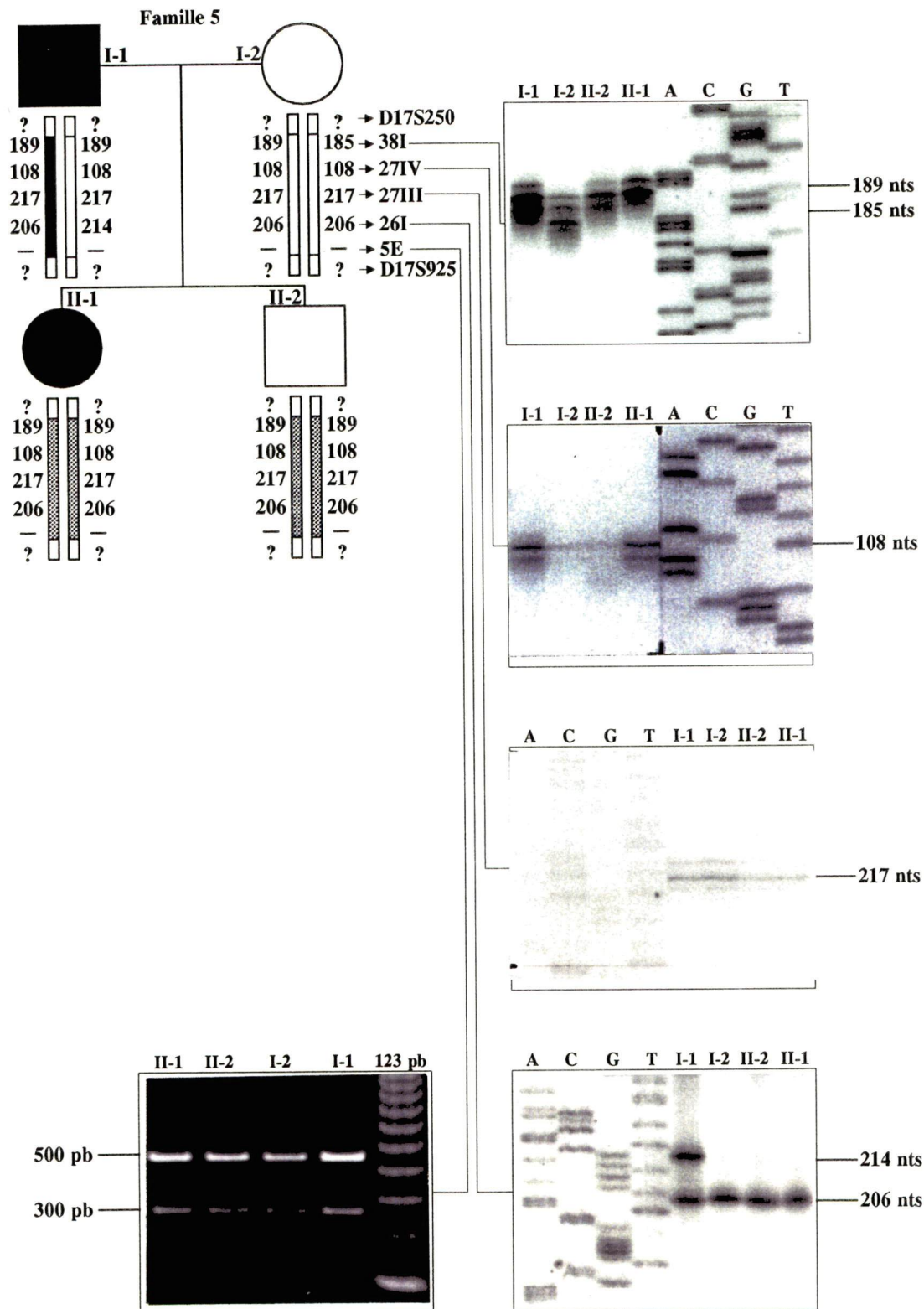


Figure 10 : Étude des haplotypes d'une famille de deux générations. L'allèle en noir (189, 108, 217, 206, -) est porteur de la mutation alors que ceux en gris pointillé indiquent que l'un des deux allèles est porteur de la mutation. C'est une famille intéressante parce qu'elle contient probablement une recombinaison entre les deux gènes NF1.

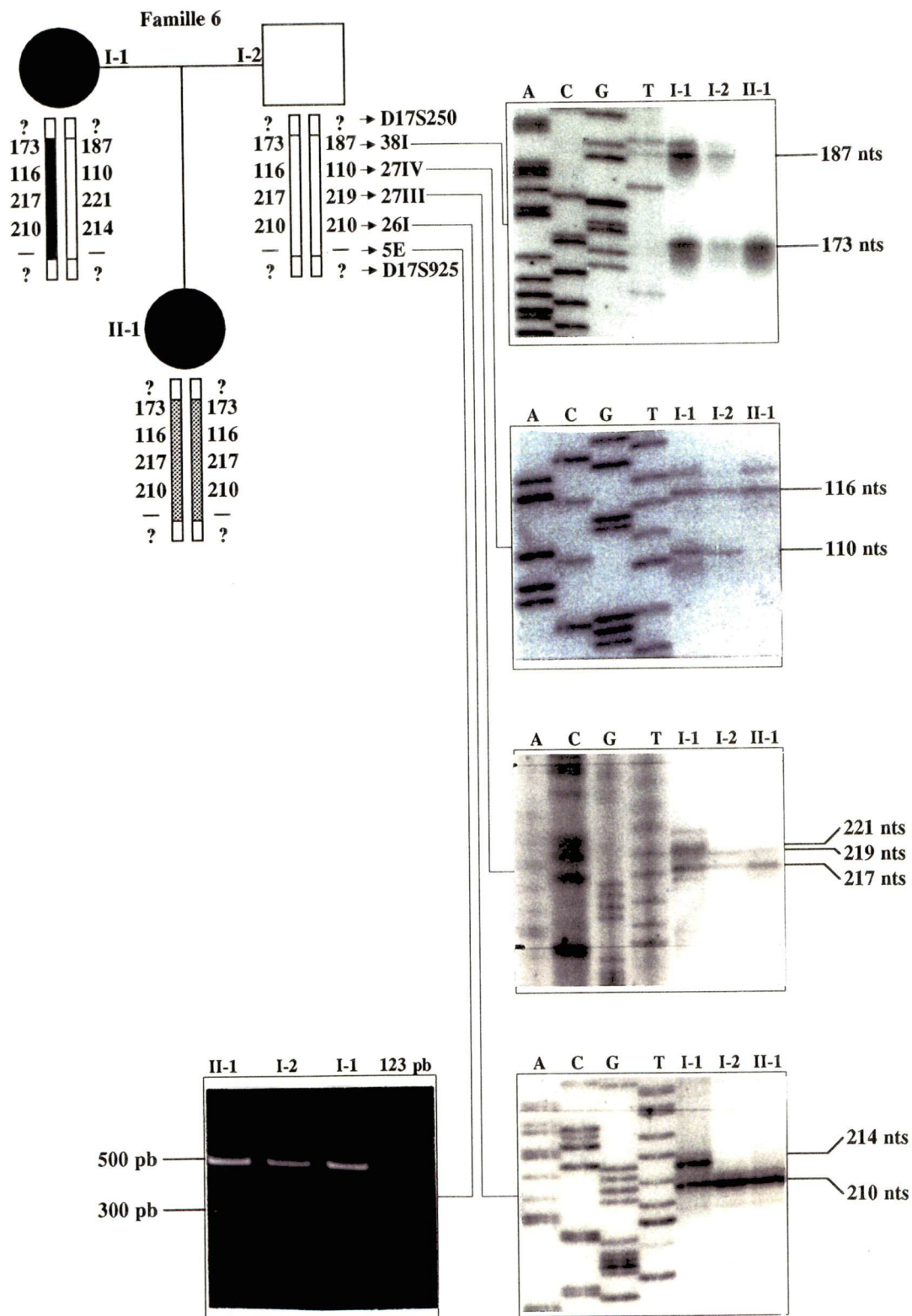


Figure 11 : Étude des haplotypes d'une famille NF1 de deux générations. L'allèle en noir (173, 116, 217, 210, -) est porteur de la mutation alors que l'un des deux allèles en gris pointillé est porteur de cette mutation.

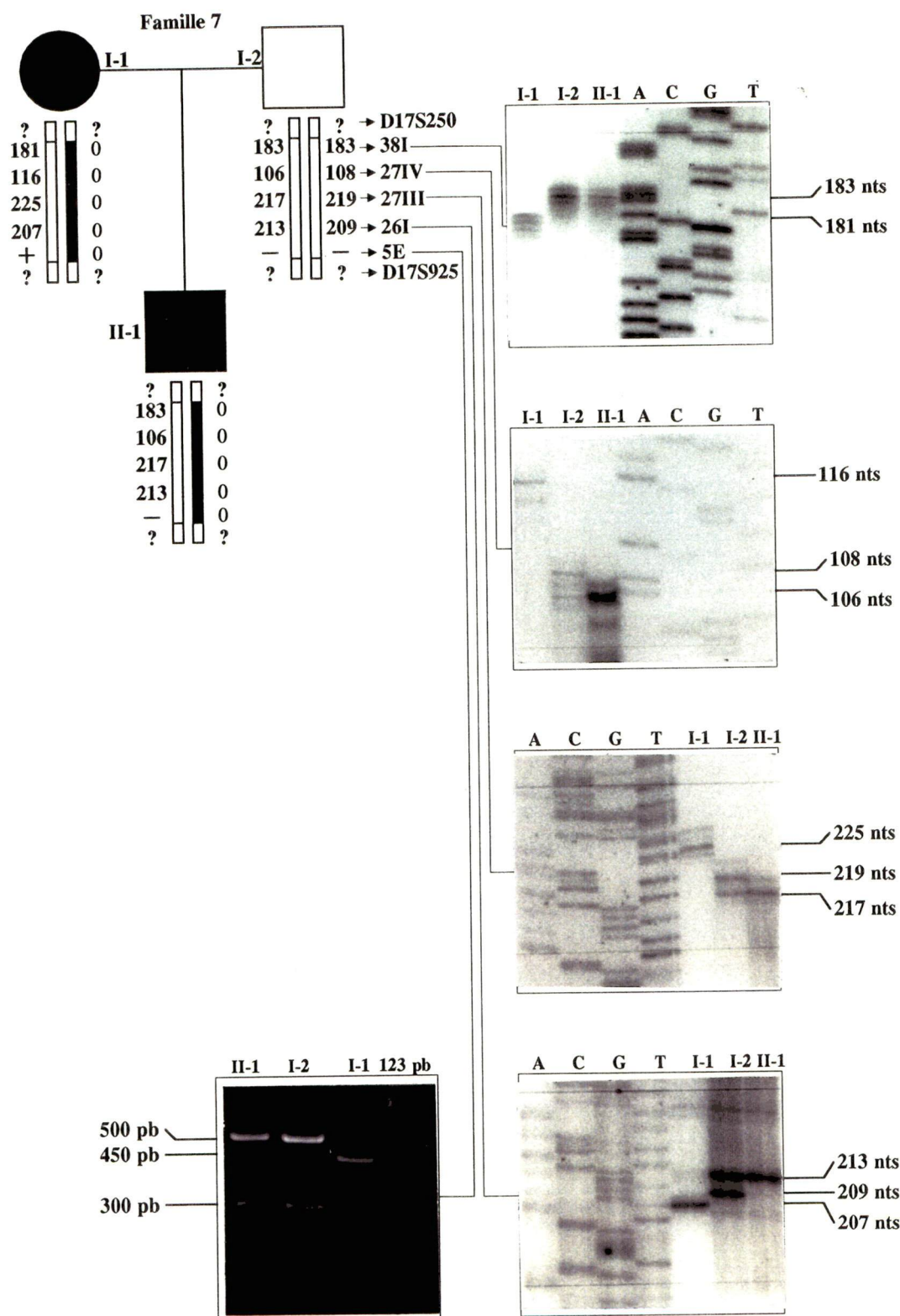


Figure 12 : Étude des haplotypes d'une famille NF1 de deux générations. L'allèle en noir (0,0,0,0,0) est l'allèle porteur de la mutation qui a été identifiée dans ce cas. C'est une grande délétion couvrant tous les marqueurs.

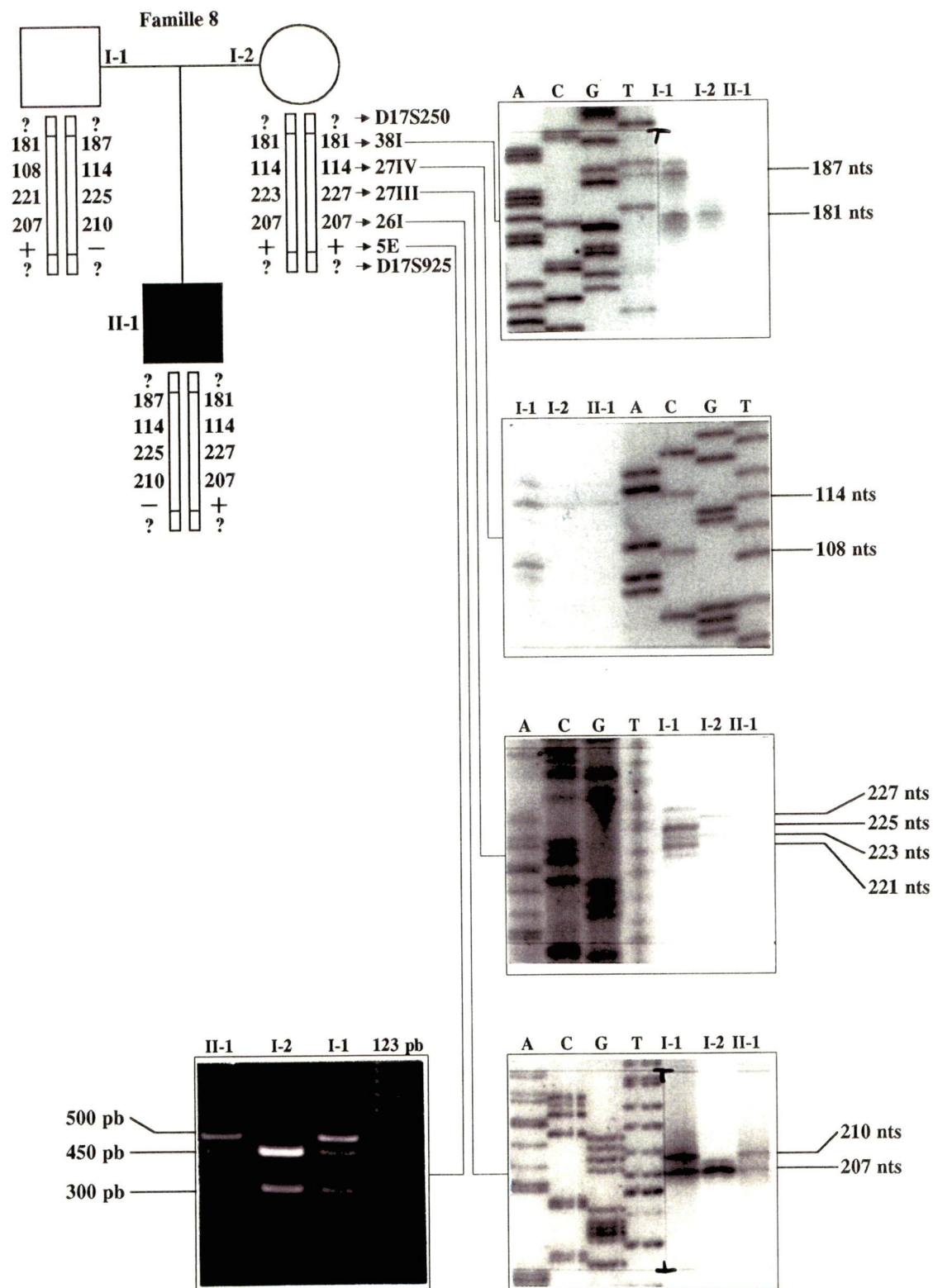


Figure 13 : Étude des haplotypes d'une famille de deux générations présentant un cas sporadique de NF1. Aucune mutation due à une perte d'hétérozygotie n'est observée chez l'individu atteint.

III.2 . Analyse de l'informativité des marqueurs utilisés dans l'étude des haplotypes

Nous avons analysé les haplotypes de neuf familles comprenant 42 individus. Sur ces 42 individus, nous avons déterminé le pourcentage des sujets hétérozygotes présents pour tous les marqueurs utilisés (microsatellites et RFLP). Cela nous permet de comparer l'informativité des microsatellites aux RFLP.

MARQUEUR UTILISÉ	POURCENTAGE D'HÉTÉROZYGOTIE	
	Obtenu sur 42 sujets analysés	Obtenu dans la littérature
26 I (microsatellites)	22/42 = 52 %	80 %
27 III (microsatellites)	20/42 = 47 %	89 %
27 IV (microsatellites)	24/42 = 57 %	84 %
38 I (microsatellites)	24/42 = 57 %	82 %
5 E (RFLP)	6/42 = 14 %	

Tableau 3 : Informativité des marqueurs utilisés dans l'analyse des haplotypes. On remarque le pourcentage élevé des microsatellites par rapport au RFLP, ce qui démontre l'avantage de l'utilisation des microsatellites.

III.3 . Recherche de mutations à partir de l'ARNm du gène NF1

Nous avons étudié dans une première étape les haplotypes des membres de neuf familles et trouvé deux délétions. Parallèlement à ces études nous avons entrepris de caractériser des mutations chez huit autres individus atteints de NF1 et d'un individu non atteint utilisé comme témoin (W.T) qui nous ont été référés soit par la clinique du Dr Lemieux soit celle du Dr Rouleau ou encore celle du Dr Ortenberg et pour lesquels nous avons obtenu des lignées lymphoblastiques. Ces individus sont référés sous l'appellation Rou 6460, Rou 44, Rou 109, Rou 5313, Rou 5001, Rou 6463, Rou 1039, Rou 1149, Rou 262. Nous avons utilisé deux approches faisant appel, soit aux techniques électrophorétiques, soit à la résolvasse, une enzyme capable de reconnaître des régions de mésappariements sur l'ADN. Dans ces deux cas, cette caractérisation s'est faite à partir des ADNc obtenus des ARNm NF1 de chaque mutant.

La taille du gène NF1 étant de 350 Kb environ, il est illusoire d'essayer de mettre en évidence des mutations parmi ces 350 Kb. Par contre, comme les cellules lymphoblastiques synthétisent toujours les ARNm de NF1, il est beaucoup plus simple de rechercher les mutations dans la région codante du gène, c'est à dire dans l'ADNc. Les ARNm des lignées lymphoblastiques de huit individus et d'une personne prise comme témoin (W.T), sans mutation dans NF1, ont été extraits en présence de TRIzol comme décrit dans Matériel et Méthodes. À partir de 3×10^6 cellules, on obtient de 10 à 15 µg d'ARN. La qualité des ARNs a été testée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en présence de tampon TBE. La figure 15 montre plusieurs exemples de préparation. La présence des deux ARNs ribosomiaux 18S et 28S non dégradés suggère fortement que les ARNm eux aussi ne sont pas dégradés. De plus, nous avons testé qu'avec ces messagers il était possible de synthétiser les ADNc par RT-PCR comme décrit dans Matériel et Méthodes.

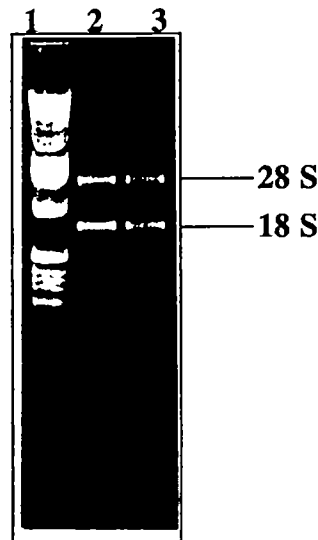


Figure 15 : Vérification de la qualité des ARNs extraits. Les bandes intenses correspondent aux ARNs ribosomiaux (18S et 28S)(pistes 2 et 3). L'électrophorèse est en gel d'agarose 1 % dans le tampon TBE. 1.2 µg d'ARN par puit en présence d'un marqueur de poids moléculaire (1 Kb, piste 1).

III.3.1 . Recherche de mutations de délétion ou d'insertion par migration électrophorétique

La synthèse de l'ADNc NF1 permet de rechercher la présence de délétion ou d'insertion parmi ces huit mutants. Chaque ADNc a été divisé en dix régions (voir figure 4). Chacune de ces régions a été amplifiée par PCR comme décrit dans Matériel et Méthodes avec dix paires d'oligonucléotides K1K2, K3K4, ...K19K20. Toutes ces régions ont pu être amplifiées par PCR sauf celle qui correspondait au couple K19K20.

Ces régions une fois amplifiées ont été étudiées par électrophorèse sur gels d'agarose 1 % pour détecter les grandes délétions ou insertions et sur gels d'acrylamide 5 % non dénaturant pour détecter les petites délétions ou insertions (seuls les produits de 632 pb amplifiés par le couple K11K12 ont été analysés sur gel d'acrylamide parce que les autres couples d'amorces amplifiaient des fragments de plus grande taille rendant

difficile leur analyse sur gel d'acrylamide). Une bande migrant plus ou moins vite par rapport au W.T serait l'indication que l'on est en présence d'une délétion ou d'une insertion. Les figures 16 et 17 montrent les résultats obtenus avec ces neuf ADNc. Pour tous sauf un (Rou 44) (figure 16F, piste 3) on ne détecte aucune différence entre le W.T et les mutants. Pour le mutant Rou 44, on détecte sur gel d'agarose un fragment additionnel qui migre plus vite que le fragment W.T. La bande d'ADN fut électroéluée et séquencée par Jocelyn Rakotoson. Les résultats ont montré qu'il n'y avait aucune relation entre cette séquence et celle du W.T. Cet ADNc est donc un artefact de l'amplification par PCR.

N'ayant pas détecté de délétion ou d'insertion grâce à l'amplification des ADNc suivie d'électrophorèse, notre attention s'est tournée vers la détection des mutations autres que les mutations de délétion ou d'insertion par l'utilisation des résolvas.

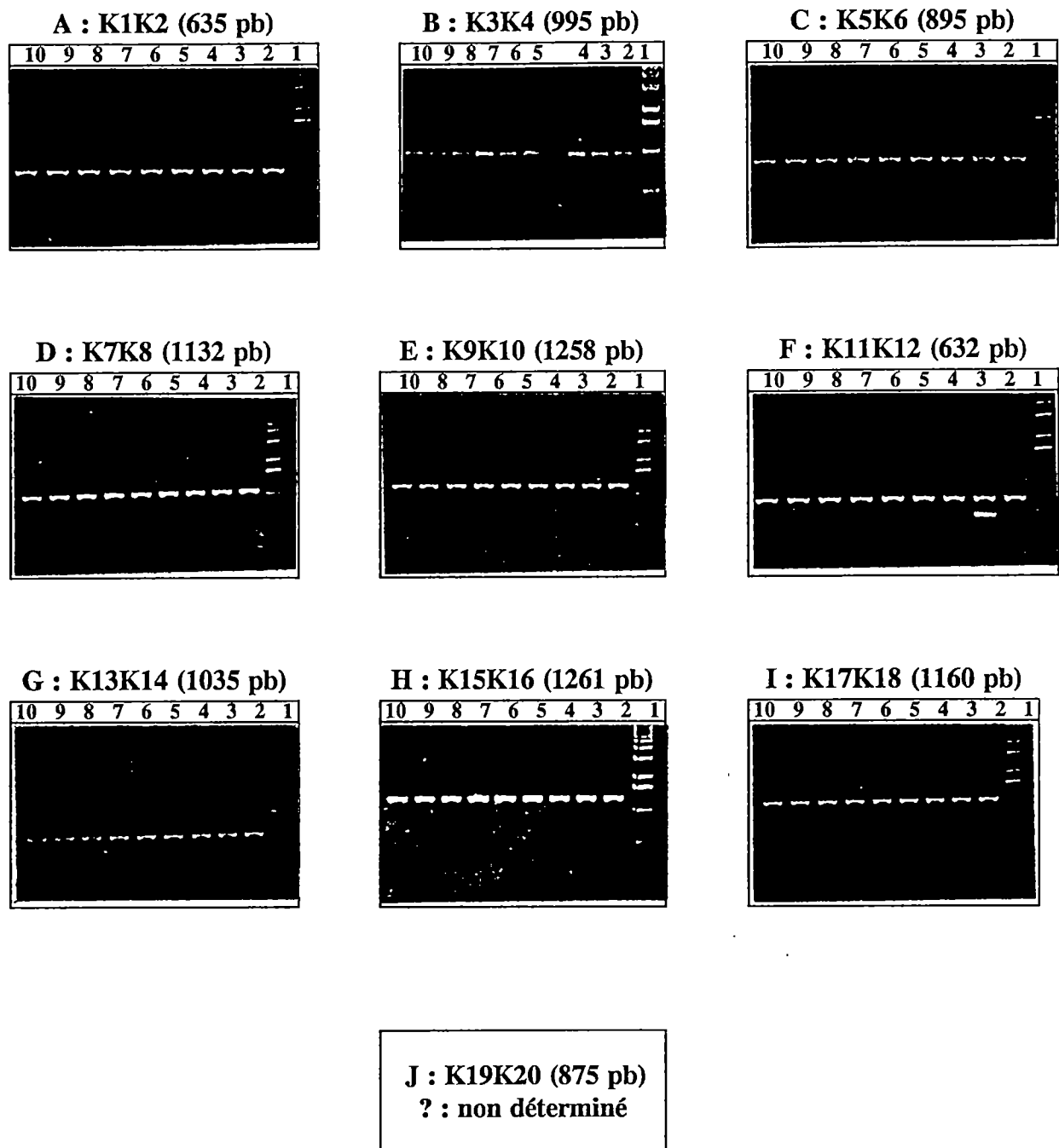


Figure 16 : Analyse moléculaire par électrophorèse en gel d'agarose 1 % des produits d'amplification par RT-PCR chez huit individus atteints de NF1 (pistes 3 à 10 respectivement : Rou 44, Rou 109, Rou 5313, Rou 5001, Rou 6463, Rou 1039, Rou 1149, Rou 262) et chez un individu normal (W.T, piste 2 : Rou 6460). Chaque gel (A à J) représente l'amplification par un couple d'amorce (voir tableau 2 pour les couples d'amorces utilisés). Remarquons la présence d'une bande supplémentaire pour l'individu Rou 44 sur le gel (F). Piste 1 : marqueur de poids moléculaire (1 Kb).

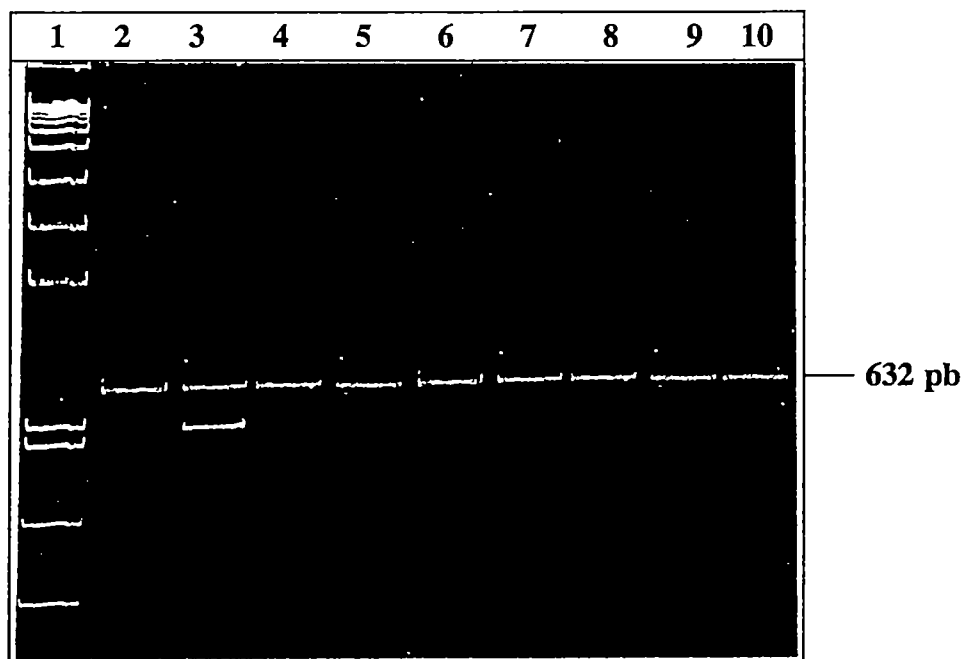


Figure 17 : Analyse moléculaire par électrophorèse en gel d'acrylamide non dénaturant 5 % des produits d'amplification par RT-PCR avec K11K12 chez huit individus atteints de NF1 (pistes 3 à 10 respectivement : Rou 44, Rou 109, Rou 5313, Rou 5001, Rou 6463, Rou 1039, Rou 1149, Rou 262) et chez un individu normal (W.T, piste 2 : Rou 6460). Piste 1 : marqueur de poids moléculaire (1 Kb).

III.3.2 . Recherche des mutations ponctuelles par la résolvasse

Il a été montré récemment par deux laboratoires (Mashal et al., 1995 ; Youil et al., 1995) que les enzymes T4E7 et T7E1 étaient capables de détecter des mutations dans les expériences de reconstruction. Lors de la formation d'hétérozygotes W.T ADN/mutant ADN, il y a mésappariement des bases là où se trouve la mutation. Ces résolvases ont la propriété de couper aux alentours du mésappariement. La coupure faite, les produits de la digestion sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide dénaturant ; la présence d'une coupure indique la présence d'une mutation qui sera confirmée par séquençage.

L'activité de l'enzyme fut testée comme décrite dans Matériel et Méthodes avec les formes superenroulées de pUC19 puisque ces enzymes sont capables de linéariser la forme superenroulée du pUC19. La figure 18 montre que seule la préparation de l'enzyme T4E7 est active. En effet, la figure montre la présence d'une molécule de 2000 pb environ qui correspond aux formes pUC19 linéarisées par EcoRI dans les pistes 3, 6, 7, 8,9 et absente dans les pistes 2,4 et 5.

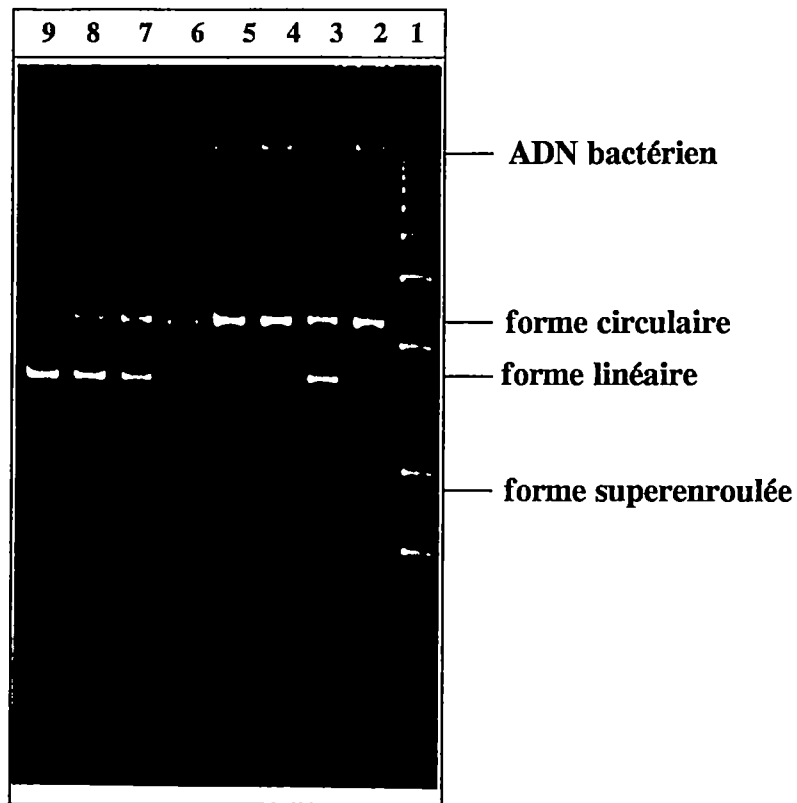


Figure 18 : Activité des enzymes résolvasse utilisées. Du pUC19 fut digéré par T4E7 et T7E1 comme décrit dans Matériel et Méthodes et les produits furent analysés sur gel d'agarose 1 %. Les pistes 2 à 4 représentent respectivement pUC19 digéré par T7E1, T4E7, T7E1. La piste 5 représente du pUC19 non digéré. Les quatre dernières pistes (6 à 9) contiennent du pUC19 digéré avec EcoRI en fonction du temps (1min, 5min, 20 min et 60 min respectivement). Piste 1 : marqueur de poids moléculaire (1 Kb).

L'enzyme T4E7 fut ensuite utilisé pour digérer des hétéroduplexes de l'adénovirus faits entre un ADN W.T et un ADN mutant obtenus du Dr Weber (voir **figure 5**). Cette expérience a été réalisée avec des hétéroduplexes dont la séquence, la taille et les positions des mésappariements étaient connues. La figure 19 montre de nombreux produits de digestion autres que ceux que l'on attendait de 696 pb, 375 pb et 321 pb (**figure 19, piste 3**). Ceci pourrait être attribué à la spécificité de l'enzyme utilisée aux mésappariements présents, c'est à dire que l'enzyme T4E7 n'est pas assez spécifique avec cet hétéroduplexe et donc fort probablement avec d'autres constructions dont celles que l'on obtiendrait avec nos mutants NF1. Comme cette enzyme détecterait aussi les polymorphismes, je n'ai pas poursuivi cette approche pour détecter les mutations.

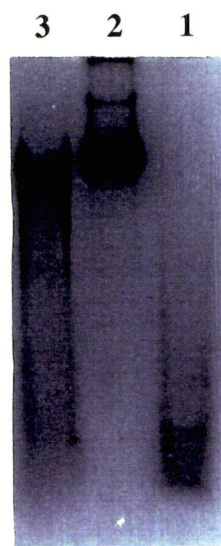


Figure 19 : Traitement des homoduplexes et des hétéroduplexes d'ADN d'adénovirus avec T4E7 et analyse par électrophorèse en gel d'acrylamide 5 % non dénaturant.

Piste 2 : homoduplexes (W.T-W.T) + T4E7 → Témoin

Piste 3 : hétéroduplexes + homoduplexes (mutant-mutant) + T4E7 → Mutant

Piste 1: marqueur de poids moléculaire (1 Kb).

IV . DISCUSSION

Le diagnostic de la maladie de von Recklinghausen (NF1) est avant tout clinique. Cependant, dû à l'expression extrêmement variable de cette maladie d'un individu à l'autre et de la très haute fréquence des formes sporadiques, il est nécessaire d'utiliser les techniques de la biologie moléculaire pour confirmer un diagnostic clinique incertain, établir un diagnostic présymptomatique ou prénatal. Cela permet d'éliminer les suivis médicaux pour les personnes qui ne sont pas à risque et dont l'un des parents est atteint.

Malgré toutes les mutations caractérisées à date, aucune corrélation entre phénotype et génotype n'a pu être établie et aucun site prédominant de mutations n'a été identifié (hot spot) ; ce qui signifie que le diagnostic moléculaire de NF1 dans les cas familiaux continue d'être indirect en se basant sur l'étude de linkage par analyse des haplotypes. Dans les cas sporadiques, la seule alternative demeure le diagnostic direct par identification de mutations impliquées dans la maladie.

Dans le diagnostic moléculaire par analyse des haplotypes, le manque de marqueurs très informatifs posait un problème majeur. Les marqueurs souvent utilisés étaient les RFLPs qui sont bi-alléliques et analysables par PCR. Récemment des marqueurs de microsatellites très informatifs ont été identifiés et se sont révélés des outils très importants dans l'analyse des haplotypes.

Au cours de ce travail, j'ai utilisé six marqueurs de microsatellites et un marqueur RFLP. Sur 42 individus analysés, les microsatellites étaient nettement plus informatifs que le RFLP en terme de pourcentage d'hétérozygotie (tableau 3). Cependant la différence entre les pourcentages d'hétérozygotie obtenus dans mon étude et ceux obtenus dans la littérature s'explique par le nombre restreint d'individus

analysés dans mon projet (42 individus). Dans ces marqueurs, on remarque bien la forme multi-allélique des microsatellites par rapport à la forme bi-allélique du RFLP (figures 6 à 14 : allèles de différentes tailles pour les microsatellites alors que deux allèles + ou – pour le RFLP), ce qui démontre clairement l'avantage des microsatellites par rapport aux RFLPs dans l'analyse des haplotypes. Cependant, l'utilisation de plusieurs marqueurs dont celui du RFLP nous a permis de couvrir une plus grande région du gène NF1 et d'identifier ainsi des mutations grâce à la perte d'hétérozygotie (figure 9).

Dans les sept cas familiaux analysés (figures 6 à 12), les différents marqueurs ont permis d'identifier l'allèle porteur de la mutation (allèle en noir) : cet allèle est présent chez tous les membres atteints d'une même famille et absent chez les membres non atteints à l'exception de la famille 5 (figure 10). Cela permet de poser un diagnostic présymptomatique pour les enfants asymptomatiques et dont on ne sait pas s'ils sont porteurs ou non.

Pour ce qui est de la famille 5 (figure 10), l'individu asymptomatique II-2 s'est montré porteur de l'allèle muté comme sa soeur malade II-1, ce qui s'expliquera de deux façons : soit que l'enfant II-2 est porteur mais n'a pas développé encore les symptômes de la maladie, et donc un diagnostic clinique approfondi nous permet alors de le vérifier ; soit qu'il s'est produit une recombinaison génétique (conversion génique) chez l'enfant II-2 permettant de transférer la région mutée seulement sur l'autre allèle lors de la méiose. Pour vérifier cette possibilité, il faudrait analyser les régions flanquant le gène NF1 par l'utilisation de marqueurs extragéniques, une approche que je n'ai pas réussi à faire fonctionner.

Chez la famille 1 (figure 6), la mère atteinte I-2 est homozygote pour tous les marqueurs utilisés, ce qui ne permet pas de dispenser le diagnostic prénatal si cette

personne ne désire pas avoir d'autres enfants atteints. Pour cela, l'utilisation d'autres marqueurs sera nécessaire afin d'identifier des allèles hétérozygotes (comme les marqueurs extragéniques par exemple).

Chez deux de ces sept familles, les marqueurs nous ont permis d'identifier deux mutations de délétion résultant en une perte d'hétérozygotie chez les individus atteints (figures 9 et 12).

Dans le cas de la famille 4 (figure 9), c'est le marqueur RFLP qui nous a permis d'identifier cette délétion. On remarque que les enfants atteints III-1 et III-2 ont hérité de l'allèle + (450 pb) de leur père normal II-2 alors qu'ils leur manque l'autre allèle – (500 pb) de leur mère atteinte II-1. Comme première observation avec les différents marqueurs utilisés, on peut dire que la délétion couvre la région s'étendant de l'exon 5 et s'arrêtant quelque part ou avant l'intron 26, parce que les individus II-1, III-1 et III-2 sont hétérozygotes pour les autres marqueurs, et que cette mutation est vraisemblablement d'origine paternelle.

Dans le cas de la famille 7 (figure 12), on remarque que les individus atteints sont hémizygotes pour tous les marqueurs. L'enfant atteint II-1 possède seulement l'allèle provenant du père normal. Les marqueurs utilisés me permettent d'identifier une délétion couvrant la ou une partie de la région qui s'étend de l'exon 5 à l'intron 38 et qui va peut être au delà.

Nous avons entrepris récemment la caractérisation de ces deux mutations par la technique de buvardage à la Southern de l'ADN génomique. sept sondes d'ADNc fournies par le Dr. Wallace (University of Florida) couvrant la totalité de l'ADNc du gène NF1 sont utilisées dans cette expérience. Cela nous permettra de cerner exactement les régions couvertes par les deux délétions avant de procéder au séquençage.

Concernant les familles 8 et 9 (figures 13 et 14), on remarque bien que ce sont des mutations nouvelles des formes sporadiques de NF1 parce qu'aucun des parents

n'est atteint. Ces familles ont été analysées dans le but de vérifier si les nouvelles mutations présentes sont des délétions comme avec les familles 4 et 7 (**figures 9 et 12**). Les résultats ne montrent aucune forme de perte d'hétérozygotie et par conséquent aucune délétion couvrant les marqueurs analysés.

Le diagnostic direct par recherche de mutations de NF1 permet d'identifier les mutations impliquées dans la survenue des manifestations cliniques de NF1 et ainsi une corrélation entre génotype et phénotype. Cela est très utile dans le diagnostic moléculaire des formes sporadiques.

À date, les connaissances concernant la pathologie du gène de la neurofibromine sont encore très incomplètes. En effet, seules quelques mutations de la maladie ont été jusqu'alors identifiées (Upadhyaya et al., 1994). La plupart de ces mutations sont des mutations ponctuelles de substitution résultant en une insertion d'un codon stop et par conséquent une protéine tronquée. Des études (Hoffmeyer et al., 1994b) ont montré une expression réduite de l'ARNm correspondant à l'allèle muté par rapport à l'allèle normal, suggérant ainsi la présence d'autres mutations pouvant affecter la région 5' promotrice du gène NF1 ou la région 3' non codante et résultant en un dérèglement du niveau de transcription, diminution de la stabilité de l'ARNm en empêchant la maturation de l'ARNm par épissage. Ni la région 5' promotrice, ni la région 3' non codante n'ont été caractérisées à date, empêchant ainsi l'identification des mutations impliquées dans l'expression dérégulée de l'ARNm du gène NF1. Une région susceptible aux mutations prédominantes de NF1 (de type point chaud) n'a pas été identifiée, ce qui empêche la centralisation des recherches vers une région précise du gène.

Au cours de ce travail, nous avons recherché des mutations de NF1 à partir de l'ARNm par analyse des produits de RT-PCR sur gel d'agarose (**figure 16**), sur gel d'acrylamide non dénaturant (**figure 17**) ou par la résolvasse. Cette approche présente les avantages suivants :

- Elle permet de caractériser non seulement des mutations présentes dans les séquences codantes mais également les mutations introniques responsables d'anomalies de maturation de l'ARN prémessager.
- Le séquençage direct des produits d'amplification permet de s'affranchir des erreurs de la Taq polymérase. Ce séquençage nous permet de différencier entre une mutation ou un polymorphisme qui ne génère pas un codon stop.

L'analyse des produits de RT-PCR sur gel d'agarose permet d'identifier les grandes délétions ou insertions, alors que l'électrophorèse en gel d'acrylamide non dénaturant permet de révéler les petites délétions ou insertions. Les résultats d'analyse chez huit individus atteints de NF1 (**figures 16 et 17**) ne montrent aucune bande supplémentaire par rapport au type normal (à l'exception de l'individu Rou 44 où une bande supplémentaire a été observée mais qui s'est révélée le résultat d'un artefact de PCR), ce qui indique l'absence de délétions ou d'insertions chez ces huit individus sans exclure la possibilité de présence de mutations ponctuelles. Cette absence de délétions ou d'insertions s'explique par le nombre restreint d'individus analysés ; à date, il a été reporté environ 45 mutations germinales chez 500 individus analysés (Upadhyaya et al., 1994).

La recherche des mutations ponctuelles était envisagée par la technique de mésappariements de bases en utilisant la résolvasse. Nos résultats ont montré que l'enzyme T4E7 était active, capable de linéariser la forme superenroulée du plasmide pUC 19 (**figure 18**). Malheureusement, l'enzyme ne semblait pas assez spécifique pour détecter les mésappariements de bases (**figure 19**). Cela nous a empêché d'appliquer cette méthode à nos mutants NF1.

V . CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les marqueurs de microsatellites se sont révélés des outils très utiles pour le diagnostic moléculaire de la NF1 dans les cas familiaux. Les quatre marqueurs intragéniques de microsatellites utilisés ont montré une informativité supérieure à celle du RFLP de l'exon 5.

Tous les marqueurs utilisés dans notre étude nous ont permis d'identifier les allèles porteurs de mutations dans les cas familiaux. Cependant, comme les marqueurs extragéniques n'ont pas fonctionné, nous ne sommes pas en mesure de vérifier la présence d'événements de recombinaison génétique, et par conséquent nous sommes incapables d'établir un diagnostic présymptomatique ou prénatal complet pour permettre le conseil génétique.

Les marqueurs utilisés nous ont permis aussi d'identifier deux mutations de délétions résultant en une perte d'hétérozygotie chez les individus atteints de NF1. Nous avons entrepris la caractérisation de ces deux délétions par buvardage à la Southern.

Dans les cas sporadiques, nous avons analysé tout l'ADNc de NF1 par RT-PCR afin d'identifier les mutations de délétions ou d'insertions. Aucune mutation n'a été identifiée, probablement dû à la taille de l'échantillon analysé (huit individus).

La résolvasse T4E7 était capable de linéariser la forme superenroulée du plasmide pUC 19, mais pas assez spécifique aux mésappariements empêchant par conséquent la recherche des mutations ponctuelles par cette méthode.

En perspective, la recherche de mutations à partir de l'ARNm de NF1 devrait nous permettre :

- De porter le diagnostic de transmetteur même en cas de mutations nouvelles.

- De contribuer à l'établissement d'une certaine corrélation entre la nature de la mutation et le phénotype clinique et évolutif de la maladie.
- D'orienter les études fonctionnelles vers tel ou tel domaine de la neurofibromine, surtout avec la suggestion récente que les cytosines méthylés des dinucléotides CpG sont plus susceptibles de subir une mutation ponctuelle que les autres bases de l'ADN (Andrews et al., 1996).

REMERCIEMENTS

Je désire exprimer mes remerciements à mon directeur de recherche, le Dr Jean-Paul Thirion, de m'avoir accepté dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ma maîtrise. Nos discussions fructueuses et ses conseils judicieux m'ont permis de réaliser ce projet.

J'aimerais également remercier les Docteurs Bernard Lemieux et Robert Giguère pour le recueil du sang des familles NF1.

À mon ami et confrère de travail, Jocelyn Rakotoson, mes plus sincères remerciements pour son aide et sa générosité.

Également, je remercie mon grand ami, Moustapha El-Amine, pour ses conseils, sa sympathie et les bons moments passés ensemble.

Je remercie infiniment tous les étudiants et le personnel du département de microbiologie pour leur amitié et leurs nombreuses contributions.

Un grand merci que j'adresse chaleureusement à tous mes amis (en médecine et en recherche) que j'ai côtoyés lors de mon séjour au CHUS. Grâce à vous, mon séjour au CHUS a été des plus agréables. Je garde un souvenir précieux de notre amitié.

Mes remerciements aussi aux membres du jury, Dr Benoit Chabot et Dr Guylain Boissonneault, d'avoir accepté de consacrer du temps à la correction de ce mémoire.

Finalement, je tiens à remercier sincèrement ma famille pour leurs encouragements, leur amour et leur soutien morale. Surtout à mon frère Fadi pour son aide et ses directives.

RÉFÉRENCES

Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M et FS Collins. A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. **Mol Cell Biol**, 13 : 487-495, 1993.

Andrews JD, Mancini DN, Singh SM et DI Rodenhiser. Site and sequence specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) gene includes C5839T : the site of the recurrent substitution mutation in exon 31. **Human Molecular Genetics**, 5 : 503-507, 1996.

Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M et FS Collins. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. **Cell**, 63 : 851-859, 1990.

Barker D, Wright E, Nguyen K, Cannon L, Fain P, Goldgar D, Bishop DT, Carey J, Baty B, Kivlin J et al. Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. **Science**, 236 : 1100-1102, 1987.

Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS et J Downward. Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumor cells from type 1 neurofibromatosis patients. **Nature**, 356 : 713-715, 1992.

Bernards A, Haase VH, Murthy AE, Menon A, Hannigan CE et JF Gusella. Complete human NF1 cDNA sequence : two alternatively spliced mRNAs and absence of expression in a neuroblastoma cell line. **DNA Cell Biol**, 11 : 727-734, 1992.

Bourne HR, Sanders DA et F McCormick. The GTPase superfamily : a conserved switch for diverse cell functions. **Nature**, 348 : 125-132, 1990.

Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA et NG Copeland. Sequence homology shared by neurofibromatosis type 1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathways. **Nature**, 347 : 291-294, 1990.

Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg AM, Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Weiss RB, Wallace MR, Marchuk DA, Culver M et al. cDNA sequence and genomic structure of EV12B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. **Genomics**, 9 : 446-460, 1991.

Cawthon R, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss RB, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG et R White. Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region : the sequence and genomic structure of EV12 and mapping of other transcripts. **Genomics**, 7 : 555-565, 1990a.

Cawthon R, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene : cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. **Cell**, 62 : 193-201, 1990b.

DeClue JE, Cohen BD et DR Lowy. Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. **Proc Natl Acad Sci USA**, 88 : 9914-9918, 1991.

DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC et DR Lowy. Abnormal regulation of mammalian p21^{ras} contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. **Cell**, 69 : 265-273, 1992.

Fountain JW, Wallace MR, Bruce MA, Seizinger BR, Menon AG, Gusella JF, Michels W, Schmidt MA, Dewald GW et FS Collins. Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis. **Science**, 244 : 1085-1087, 1989.

Gaul U, Mardon G, GM Rubin. A putative Ras GTPase activating protein acts as a regulator of signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase. **Cell**, 68 : 1007-1019, 1992.

Gutmann DH, Wood DL et FS Collins. Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. **Proc Natl Acad Sci USA**, 88 : 9658-9662, 1991.

Gutmann DH et FS Collins. The neurofibromatosis type 1 gene and its protein product, neurofibromin. **Neuron**, 10 : 335-343, 1993.

Hoffmeyer S et G Assum. An Rsa I polymorphism in the transcribed region of the neurofibromatosis (NF1) gene. **Hum Genet**, 93 : 481-482, 1994.

Hoffmeyer S, Assum G, Kaufmann D, Schwenk K et W Krone. A deletion in the 5'-region of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. **Hum Genet**, 94 : 97-100, 1994a.

Hoffmeyer S, Assum G, Kaufmann D et W Krone. Unequal expression of NF1 alleles. **Nature Genetics**, 6 : 331, 1994b.

Jadayel D, Fain P, Upadhyaya M, Ponder MA, Huson SM, Carey J, Fryer A, Mathew CG, Barker DF et BA Ponder. Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. **Nature**, 343 : 558-559, 1990.

Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, Leppert M et JC Carey. Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation. **Am J Hum Genet**, 44 : 20-24, 1989.

Legius E, Marchuk DA, Hall BK, Andersen LB, Wallace MR, Collins FS et TW Glover. NF1-related locus on chromosome 15. **Genomics**, 13 : 1316-1318, 1992.

Marchuk DA, Saulino AM, Tavakkol R, Swaroop M, Wallace MR, Andersen LB, Mitchell AL, Gutmann DH, Boguski M et FS Collins. cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene : complete sequence of the NF1 gene product. **Genomics**, 11 : 931-940, 1991.

Marchuk DA, Tavakkol R, Wallace MR, Brownstein BH, Taillon-Miller P, Fong CT, Legius E, Andersen LB, Glover TW et FS Collins. A yeast artificial chromosome contig encompassing the type 1 neurofibromatosis gene. **Genomics**, 13 : 672-680, 1992.

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Couroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM et al. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. **Cell**, 63 : 843-849, 1990.

Mashal RD, Koontz J et J Sklar. Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. **Nature Genetics**, 9 : 177-183, 1995.

Menon AG, Ledbetter DH, Rich DC, Seizinger BR, Rouleau GA, Michels VF, Schmidt MA, Dewald G, Dallatorre CM, Haines JL et al. Characterization of a translocation within the von Recklinghausen neurofibromatosis region of chromosome 17. **Genomics**, 5 : 245-249, 1989.

Nishi T, Lee PS, Oka K, Levin VA, Tanase S, Marino Y et H Saya. Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. **Oncogene**, 6 : 1555-1559, 1991.

O'Connell P, Leach R, Cawthon RM, Culver M, Stevens J, Viskochil D, Fournier RE, Rich DC, Ledbetter DH et R White. Two NF1 translocations map within a 600-Kilobase segment of 17q11.2. **Science**, 244 : 1087-1088, 1989.

O'Connell P, Viskochil D, Buchberg AM, Fountain J, Cawthon RM, Culver M, Stevens J, Rich DC, Ledbetter DH, Wallace M et al. The human homolog of murine EVI-2 lies between two von Recklinghausen neurofibromatosis translocations. **Genomics**, 7 : 547-554, 1990.

Riccardi VM. Neurofibromatosis : phenotype, natural history, and pathogenesis. Baltimore : Johns Hopkins University Press, 1992.

Riccardi VM, Dobson CE, Chakraborty R et C Bontke. The pathophysiology of neurofibromatosis : IX. Paternal age as a factor in the origin of new mutations. **Am J Med Genet**, 18 : 169-176, 1984.

Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, Coulter-Mackie MB, Singh SM et JH Jung. A genetic study of neurofibromatosis type 1 (NF1) in south-Western Ontario. II A PCR based approach to molecular and prenatal diagnosis using linkage. **J Med Genet**, 30 : 363-368, 1993.

Sambrook J, Fritsch EF et T Maniatis. Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, second edition, 1989.

Schmidt MA, Michels VV et GW Dewald. Cases of neurofibromatosis with rearrangements of chromosome 17 involving band 17q11.2. **Am J Med Genet**, 28 : 771-777, 1987.

Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Faryniarz AG, Chao MV, Huson S, Korf BR, Parry DM, Pericak-Vauce MA et al. Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. **Cell**, 49 : 589-594, 1987.

Suzuki Y, Suzuki H, Kayama T et S Shibahara. Brain tumors predominantly express the neurofibromatosis type 1 gene transcript containing the 63 base insert in the region coding for GTPase activating protein-related domain. **Biochem Biophys Res Commun**, 181 : 955-961, 1991.

Teinturier C, Danglot G, Slim R, Pruliere D, Launay JM et A Bernheim. The neurofibromatosis 1 gene transcripts expressed in peripheral nerve and neurofibromas bear the additional exon located in the GAP domain. **Biochem Biophys Res Commun**, 188 : 851-857, 1992.

Upadhyaya M, Fryer A, McMillan J, Broadhead W, Huson SM et PS Harper. Prenatal diagnosis and presymptomatic detection of neurofibromatosis type 1. **J Med Genet**, 29 : 180-183, 1992.

Upadhyaya M, Shaw DJ et PS Harper. Molecular basis of neurofibromatosis type 1 (NF1) : mutation analysis and polymorphisms in the NF1 gene. **Human mutation**, 4 : 83-101, 1994.

Viskochil D, Buchberg AM, Xu GF, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. **Cell**, 62 : 187-192, 1990.

Viskochil D, Cawthon R, O'Connell P, Xu GF, Stevens J, Culver M, Carey J et R White. The gene encoding the oligodendrocyte myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. **Mol Cell Biol**, 11 : 906-912, 1991.

Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL et al. Type 1 neurofibromatosis gene : identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. **Science**, 249 : 181-186, 1990.

Wang Y, Boguski M, Riggs M, Rodgers L et M Wigler. Sar1, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* encoding a protein that regulates ras1. **Cell Reg**, 2 : 453-465, 1991.

Xu GF, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, White R, Weiss R et F Tamanoi. The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. **Cell**, 63 : 835-841, 1990a.

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. **Cell**, 62 : 599-608, 1990b.

Youil R, Kemper BW et RG Cotton. Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. **Proc Natl Acad Sci USA**, 92 : 87-91, 1995.